



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Η επίδραση της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία και του HIF-1 στους μηχανισμούς απόπτωσης και σχηματισμού κοκκιδίων του στρες»

Υφαντής Άγγελος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Γεώργιος Σίμος, Καθηγητής Βιοχημείας, Επιβλέπων
- Ηλίας Μυλωνής, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Βιοχημεία

Λάρισα, Νοέμβριος, 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
«The effects of the cellular response to hypoxia and HIF-1 on the apoptosis
and stress granule formation mechanisms»

Yfantis Angelos

Advisory Thesis Committee:

- George Simos, Professor of Biochemistry, Supervisor
- Ilias Mylonis, Assistant Professor of Biochemistry
- Anastasios Germenis, Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Biochemistry

Larissa, November, 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Βιοχημείας, κ.Γεώργιου Σίμου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Βιοχημείας κ.Σίμο Γεώργιο για την ευκαιρία που μου έδωσε από την πρώτη στιγμή να ενταχθώ στο εργαστήριο Βιοχημείας, για την αμέριστη ψυχολογική και ηθική συμπαράσταση καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας και τις γνώσεις που μου προσέφερε αυτούς τους 12 δημιουργικούς και ταυτόχρονα επικοδομητικούς μήνες στο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών. Τον ευχαριστώ για την προσπάθεια, την υπομονή, την επιμονή, τις παραινήσεις, καθώς και τη γενικότερη στήριξη του στην απόπειρα μου να μάθω, να διευρύνω το γνωστικό μου υπόβαθρο και να αποκτήσω αυτονομία στο χώρο εργασίας μου, στοιχεία τα οποία εκτίμησα ιδιαίτερα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ.Μυλωνή Ηλία καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες κ.Κουκουλά Κρέων και κ.Καραγιώτα Αγγελική, καθώς η βοήθεια τους κατά τη διεξαγωγή των πειραματικών τεχνικών στο εργαστήριο Βιοχημείας ήταν κάτι παραπάνω από πολύτιμη. Τους ευχαριστώ για την καθοδήγηση, τις συμβουλές, και τις γνώσεις που μου προσέφεραν από την έναρξη του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών, οι οποίες συνεισέφεραν θετικά στην επιτυχή διεκπεραίωση και εμπέδωση των πειραματικών τεχνικών που διδάχθηκα. Τους ευχαριστώ για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν ώστε η παραμονή μου στο εργαστήριο να είναι κάτι παραπάνω από επικοδομητική και δημιουργική.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ.Γερμενή Αναστάσιο για τη δημιουργία και συντονισμό ενός τόσο ενδιαφέροντος προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών και τον εμπλουτισμό του προγράμματος αυτού με διαλέξεις επιστημόνων με υψηλό ακαδημαϊκό και ερευνητικό υπόβαθρο στο ενεργητικό τους, προσδίδοντας με αυτόν τον τρόπο υψηλό επιμορφωτικό χαρακτήρα.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά όλα τα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ που στελεχώνουν το εργαστήριο Βιοχημείας για τις γνώσεις που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια των μαθημάτων στο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών και την προθυμία τους για την επίλυση οποιουδήποτε θέματος ακαδημαϊκού χαρακτήρα που αφορούσε την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Ίδρυμα Μποδοσάκη, το οποίο με τη συνεπέστατη χρηματοδότηση του αποτέλεσε ένα ισχυρό οικονομικό υπόβαθρο κατά τη διάρκεια των

μεταπτυχιακών μου σπουδών μέσω της χορήγησης υποτροφίας στο πλαίσιο του 44ου τακτικού προγράμματος χορήγησης υποτροφιών.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω, όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας δηλαδή τις υποψήφιες διδακτορικές φοιτήτριες κ.Ταζέ Χρύσα και κ.Γκοτινάκου Ιωάννα, τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ.Μπεφάνη Χριστίνα και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες κ.Γκατζώνα Παγώνα και κ.Κεχαγιά Ελένη που με το χαρούμενο, αισιόδοξο και φιλικό πνεύμα τους αποτέλεσαν σημαντικό στήριγμα κατά τη διάρκεια της ακαδημαϊκής μου πορείας.

Τέλος, θα ήθελα μέσα από ολή μου την καρδιά, να ευχαριστήσω την οικογένεια μου: τη μητέρα μου Μαραγκοπούλου Θεανώ, τη γιαγιά μου Μαραγκοπούλου Σμαράγδα, τα αδέρφια μου Γκινίδη Κυριάκο και Γκινίδη Μαρία. Η ηθική, ψυχολογική και οικονομική συμπαράστασή τους αποτέλεσαν θεμέλιο λίθο στην συνέχεια της πορείας μου. Η ατελείωτη αγάπη τους, ο αισιόδοξος και χαρούμενος χαρακτήρας τους και η προσπάθεια που κατέβαλλαν και καταβάλλουν για μένα στα δύσκολα και στα εύκολα κάθε ώρα και στιγμή είναι κάτι ανεκτίμητο. Η πλήρης στήριξη από μέρους δεν μπορεί να περιγραφεί στα όρια μίας παραγράφου και τους ευχαριστώ για άκομα μία φορά καθώς χωρίς την απλόχερη αρωγή τους δεν θα είχα καταφέρει να επιτύχω μία τόσο δημιουργική σταδιοδρομία. Ακόμα, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον πιο κοντινό μου φίλο Ντάφο Κωνσταντίνο καθώς και όλους τους υπόλοιπους φίλους μου χάρη στους οποίους η παραμονή μου στη Νέα Αγχίαλο υπήρξε όσο πιο όμορφη μπορούσα να φανταστώ και ακόμα περισσότερο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ελάττωση των επιπέδων διαθέσιμου οξυγόνου (υποξία) σε κύτταρα και ιστούς είναι χαρακτηριστικό πολλών φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων. Οι κύριοι ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία είναι οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (HIFs). Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία και του HIF-1 α) στους μιτοχονδριακούς μηχανισμούς απόπτωσης και β) στους μηχανισμούς σχηματισμού των κοκκιδίων του στρες που αποτελούν μέσα αποτροπής της απόπτωσης. Σε πρόσφατη δημοσίευση του εργαστηρίου Βιοχημείας, αποδείχθηκε πως σε υποξικές συνθήκες και κάτω από συνθήκες αναστολής των κινασών ERK, ο ενδογενής HIF-1α αλληλεπιδρά, μέσω της περιοχής ETD (αμινοξέα 616-658, ERK Targeted Domain), με την πρωτεΐνη μορταλίνη και μέσω αυτής μετατοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια των μιτοχονδρίων όπου αναστέλλει την έναρξη της απόπτωσης. Ωστόσο, η περιοχή ETD από μόνη της δεν είναι ικανή να εμποδίσει την απόπτωση υποδεικνύοντας ότι εκατέρωθεν της ETD (αμινοξέα 348-616 και 658-826), υπάρχουν πιθανές θέσεις αλληλεπίδρασης για πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τον αντι-αποπτωτικό ρόλο του HIF-1α στα μιτοχόνδρια. Για αυτό το λόγο, στο πρώτο μέρος της εργασίας το cDNA της αμινοξικής αλληλουχίας 348-616 του HIF-1α κλωνοποιήθηκε σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και μαζί με τα ήδη κλωνοποιημένα cDNA των αλληλουχιών 530-826 και 652-826 χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση και απομόνωση των αντίστοιχων πρωτεϊνών σε σύντηξη με GST. Αυτές στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως δολώματα για τη απομόνωση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών από εκχυλίσματα κυττάρων Huh7. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την αλληλεπίδραση της μορταλίνης με το τμήμα αμινοξέων 530-826 του HIF-1α και επιπλέον έδειξαν ότι η μορταλίνη δεν δεσμεύεται στα τμήματα αμινοξέων 348-616 και 652-826 του HIF-1α, υποδεικνύοντας ότι η ETD εκτός από επαρκής είναι και αναγκαία για την δέσμευση της μορταλίνης. Εκλούσματα των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στις περιοχές αμινοξέων 348-616 και 652-826 του HIF-1α θα χρησιμοποιηθούν για ανάλυση με φασματοσκοπία μαζών με στόχο την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που πιθανόν εμπλέκονται στην μιτοχονδριακή αντι-αποπτωτική δράση του HIF-1α.

Δεδομένου του ρόλου του HIF-1α στην προστασία από την μιτοχονδριακή απόπτωση, μελετήθηκε η σχέση της υποξίας με έναν άλλο βασικό αντι-αποπτωτικό μηχανισμό που είναι ο σχηματισμός των κοκκιδίων του στρες. Τα κοκκίδια του στρες αποτελούν ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συσσωματώματα mRNA που σχηματίζονται στο κυτταρόπλασμα κυττάρων που έχουν υποβληθεί σε κάποιου είδους στρεσογόνο ερέθισμα. Συγκεκριμένα, σε κυτταρικές σειρές Huh7 και σε MCF7 μελετήθηκε η επίδραση της έκθεσης για 4 ή 24 h σε ήπια υποξία (1% O₂) στο σχηματισμό και τη δυναμική των κοκκιδίων του στρες που επάγονται από

οξειδωτικό στρες προκαλούμενο από προσθήκη NaAsO_2 (0,5 mM για 30 min) στη κυτταροκαλλιέργεια. Αντίστοιχα, μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης NaAsO_2 στα πρωτεϊνικά επιπέδα του HIF-1 α . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υποξία από μόνη της δεν επάγει το σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες ούτε εμποδίζει την επαγωγή τους από το οξειδωτικό στρες αλλά επηρεάζει τον αριθμό και το μέγεθος τους. Συγκεκριμένα, προεπώαση των κυττάρων σε 1% O_2 για 4 h πριν την προσθήκη NaAsO_2 οδηγεί σε αύξηση του μέσου αριθμού ανά κύτταρο και μείωση του μέσου μεγέθους των κοκκιδίων του στρες σε σύγκριση με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε υποξία. Αντίθετα, όταν η διάρκεια της υποξικής προεπώασης αυξήθηκε σε 24h, παρατηρήθηκε μείωση του μέσου αριθμού ανά κύτταρο και αύξηση μέσου μεγέθους των κοκκιδίων του στρες. Μετά από υποξία 4 h, η επίδραση με NaAsO_2 προκάλεσε τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1 α σε κύτταρα MCF7, γεγονός που παρατηρήθηκε και σε κύτταρα Huh7 μετά από 24 h υποξίας. Συμπερασματικά, η υποξία, ανάλογα με τη διάρκεια της, επηρέασε διαφορετικά τον αριθμό και μέγεθος των κοκκιδίων του στρες, η δημιουργία των οποίων ανέστειλε επίσης την επαγωγή του HIF-1 α , υποδεικνύοντας σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της κυτταρικής προσαρμογής στην υποξία και των μηχανισμών σχηματισμού κοκκιδίων του στρες στα καρκινικά κύτταρα.

Λέξεις κλειδιά: HIF-1 α , Υποξία, απόπτωση, μορταλίνη, κοκκίδια του στρες

ABSTRACT

Oxygen deprivation (hypoxia) in cells and tissues is a situation encountered in many physiological and pathological conditions. Hypoxia Inducible Factors (HIF) are the key transcriptional activators of the cellular response to hypoxia.

Aim of the present study was the study of the effect of the cellular response to hypoxia and HIF-1 on a) the mitochondrial apoptotic machinery and b) the mechanisms of stress granule formation, which are alternative means of preventing apoptosis. The Laboratory of Biochemistry has recently shown that ERK kinase inhibition under hypoxia triggers interaction of endogenous HIF-1 α , via its ETD (ERK Targeted Domain; amino acids 616-658), with mortalin and its concomitant translocation onto the outer mitochondrial membrane, which confers resistance to apoptosis. However, ETD is not capable of inhibiting apoptosis on its own, suggesting that domains adjacent to ETD (amino acids 348-616 and 658-826), may provide interaction positions for proteins required for the mitochondrial anti-apoptotic activity of HIF-1 α . For this reason, as the first part of the current work, the cDNA coding for HIF-1 α amino acid sequence 348-616 was cloned in a suitable plasmid vector and, together with the already cloned cDNAs for sequences 530-826 and 652-826 of HIF-1 α were used for overexpression and isolation of the corresponding GST-fusion proteins. These were then used as baits for the co-precipitation of interacting proteins from Huh7 cell extracts. The results confirmed the interaction of mortalin with HIF-1 α (530-826) and, additionally, showed that mortalin does not bind to HIF-1 α (348-616) or HIF-1 α (652-826), suggesting that ETD is not only sufficient but also necessary for interaction with mortalin. Eluates containing proteins that bound to either HIF-1 α (348-616) or HIF-1 α (652-826) will be analysed by mass spectroscopy, in order to identify proteins probably involved in the mitochondrial anti-apoptotic activity of HIF-1 α .

Given the role of HIF-1 α in protection from mitochondrial apoptosis, an attempt was made to study the effects of hypoxia on another basic anti-apoptotic mechanism involving stress granule formation. Stress granules are mRNA ribonucleoprotein complexes that form in the cytoplasm of cells exposed to particular types of stress. Specifically, Huh7 and MCF7 cell lines were used to study how exposure to either 4 or 24 h of mild hypoxia (1% O₂) affected formation and dynamics of stress granules induced by oxidative stress triggered by the addition of NaAsO₂ (0.5 mM for 30 min) in the cell culture. The corresponding effect of NaAsO₂ addition on HIF-1 α protein levels was also studied. The results showed that hypoxia alone does not induce formation of stress granules nor inhibits their induction by oxidative stress but affects their number and size. More specifically, incubation of cells at 1% O₂ for 4 h before addition of NaAsO₂ led to

increase of the mean number of per cell and decrease of mean size of stress granules compared to cells grown under normoxia. In contrast, after 24 h of hypoxia, NaAsO₂ addition resulted in fewer and larger stress granules compared again to normoxic conditions. After 4 h of hypoxia, addition of NaAsO₂ caused a decrease in HIF-1 α protein levels in MCF7 cells, which was also observed in Huh7 cells grown for 24 h under hypoxia. In conclusion, hypoxia, depending on its duration, affects differently both the number and size of stress granules, the formation of which also perturbs HIF-1 α expression, indicating an important cross-talk between adaptation to hypoxia and the mechanisms underlying stress granule formation and dynamics in cancer cells.

Key words: HIF-1 α , Hypoxia, Apoptosis, Mortalin, Stress granules

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1 Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ.....	13
1.1.1 Υποξία	13
1.1.2 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF.....	13
1.1.2.1 Δομή.....	13
1.1.2.2 Λειτουργία.....	15
1.1.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ HIF ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ.....	16
1.1.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	17
1.1.5 Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-1α.....	19
1.1.5.1 Οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α.....	19
1.1.5.2 Μη οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α	21
1.1.5.2.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής.....	21
1.1.5.2.2 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης	22
1.1.5.2.3 Αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες.....	23
1.1.5.2.4 Ρύθμιση από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	23
1.1.5.2.5 Ρύθμιση της μεταφοράς του HIF-1α στον πυρήνα.....	25
1.1.5.2.6 Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2.....	25
1.1.6 HIF-1α ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ	27
1.2 ΓΕΝΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ	30
1.2.1 ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΟ ΣΤΡΕΣ: ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ	30
1.2.1.1 Στάδια του συστήματος ολοκληρωμένης απόκρισης στο στρες	30
1.2.1.2 Δομή των κινασών του eIF2α και ενεργοποίησή τους από στρεσογόνα ερεθίσματα ...	31
1.2.1.3 Φωσφορυλίωση του eIF2α και αναστολή της μετάφρασης	33

1.2.2	KOKKIDIA TOY ΣΤΡΕΣ.....	34
1.2.2.1	Πρωτεΐνες δέσμευσης RNA ως συστατικά των κοκκιδίων του στρες.....	35
1.2.2.2	Ενδογενώς αδόμητες περιοχές: ρόλος στη δυναμική και στη συναρμολόγηση των κοκκιδίων του στρες.....	36
1.2.2.3	Οι γενικές λειτουργίες των κοκκιδίων του στρες	38
1.2.2.4	Αρσενικό, κοκκίδια του στρες, καρκίνος και υποξία	40
2.	ΣΚΟΠΟΣ	44
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
3.1	ΥΛΙΚΑ	45
3.1.1	Βακτηριακά στελέχη	45
3.1.2	Κυτταρικές σειρές	45
3.1.3	Μέσα κυτταροκαλλιέργειας.....	45
3.1.4	Πλασμιδιακοί φορείς.....	47
3.1.5	Υλικά χρωματογραφίας.....	47
3.1.6	Εκκινητές.....	47
3.1.7	Αντισώματα	48
3.1.8	Ένζυμα.....	48
3.1.9	Χημικά.....	48
3.2	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
3.2.1	Απομόνωση και πολλαπλασιασμός τμημάτων της αλληλουχίας cDNA του HIF-1α με PCR	49
3.2.2	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	50
3.2.3	Κλωνοποίηση του τμήματος cDNA που κωδικοποιεί την αμινοξική αλληλουχία 348-616 του HIF-1α σε πλασμιδιακό φορέα.....	51
3.2.3.1	Πέψεις.....	51
3.2.3.2	Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)	52
3.2.3.3	Αντίδραση λιγάσης (ligation).....	53
3.2.3.4	Παρασκευή επιδεκτικών για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων.....	53
3.2.3.5	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	54
3.2.3.6	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (mini-preparation)	55

3.2.3.7	Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (έλεγχος εισαγωγής ενθέματος και έλεγχος προσανατολισμού)	56
3.2.4	Υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HIF-1α 348-616/530-826/652-826	56
3.2.5	Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.	57
3.2.6	Δοκιμές συγκατακρήμνισης (in vitro pull down assay) πρωτεϊνών.....	58
3.2.7	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	60
3.2.8	Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).	61
3.2.9	Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου με νιτρικό άργυρο (AgNO ₃).	64
3.2.10	Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοανίχνευση.	64
3.2.11	Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών.....	66
3.2.12	Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	67
3.2.13	Ποσοτική ανάλυση σχηματισμού κοκκιδίων του στρες.....	68
3.2.14	Ψύξη κυττάρων θηλαστικών.....	69
3.2.15	Απόψυξη κυττάρων θηλαστικών.....	69
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71
4.1	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ HIF-1α.....	71
4.1.1	Κλωνοποίηση του τμήματος cDNA που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία 348-616 του HIF-1α.....	71
4.1.2	Υπερέκφραση και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων GST-HIF-1α(348-616), GST-HIF-1α(530-826) και GST-HIF-1α(652-826).	75
4.1.3	Συγκατακρήμνιση (in vitro pull down assays) πρωτεϊνών κυττάρων Huh7 με τις χημεικές πρωτεΐνες GST-HIF-1α 530-826, GST-HIF-1α 652-826 και GST-HIF-1α 348-616	78
4.2	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΤΟΥ HIF-1 ΜΕ ΤΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΟΚΚΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ.....	79

4.2.1	Ανάλυση με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού του σχηματισμού κοκκιδίων του στρες	79
4.2.2	Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α	92
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	93
5.1	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΑΡΒΟΞΥΤΕΛΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗ ΤΟΥ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	93
5.2	Η ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕ ΤΑ ΚΟΚΚΙΔΙΑ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ.....	95
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	98

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ

1.1.1 Υποξία

Η ομοιοστασία του οξυγόνου αποτελεί μία πολύ σημαντική αρχή για την κατανόηση της εξέλιξης, της βιολογίας και της Ιατρικής. Η εξέλιξη μονοκύτταρων οργανισμών που έχουν τη δυνατότητα αξιοποίησης της φωτοσύνθεσης, οδήγησε σε κατακόρυφη αύξηση των επιπέδων του ατμοσφαιρικού οξυγόνου, φαινόμενο που ακολουθήθηκε από την εξέλιξη οργανισμών που λειτουργούν μέσω της διαδικασίας της αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα αυτής της διαδικασίας παραγωγής ενέργειας η οποία χρησιμοποιεί το οξυγόνο ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων για την παραγωγή ATP, τροφοδότησε την ανάπτυξη πολύπλοκων πολυκύτταρων οργανισμών. Η εξέλιξη των διαφορετικών ειδών μεταζώων βασίστηκε στη διαχείριση αρκετά πολύπλοκων συστημάτων για τη μεταφορά του οξυγόνου, καταλήγοντας στην ανάπτυξη του κυκλοφορικού και του αναπνευστικού συστήματος των σύγχρονων θηλαστικών (1).

Η μείωση του διαθέσιμου οξυγόνου για έναν οργανισμό, ιστό ή κύτταρο, κάτω από ένα επίπεδο ορίζεται ως υποξία. Υποξικές συνθήκες εμφανίζονται φυσιολογικά σε μεγάλο υψόμετρο, μετά από έντονη μυϊκή άσκηση αλλά αποτελούν χαρακτηριστικό και πολλών άλλων φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων στον οργανισμό (2). Η συνεχής υποξία αποτελεί απαραίτητη συνθήκη για την προαγωγή της εμβρυογένεσης στα θηλαστικά (3), την ερυθροποίηση, αλλά και τη διατήρηση και ομαλή λειτουργία βλαστικών κυττάρων, κατά την ανάπτυξη διαφόρων ιστών (αίματος, οστών) (4,5). Ωστόσο, έχει επιβεβαιωθεί συσχέτιση μεταξύ της υποξίας και της παθοφυσιολογίας διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος και η ισχαιμία (1).

Η απόκριση του κυττάρου στην υποξία περιλαμβάνει μια γρήγορη φάση που καθορίζεται από μια σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων πρωτεϊνών, ενώ ακολουθεί μια καθυστερημένη φάση ρύθμισης της έκφρασης στοχευμένων γονιδίων και πρωτεϊνοσύνθεσης. Οι κύριοι ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία είναι μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που είναι γνωστοί ως επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες HIF (Hypoxia Inducible Factors).

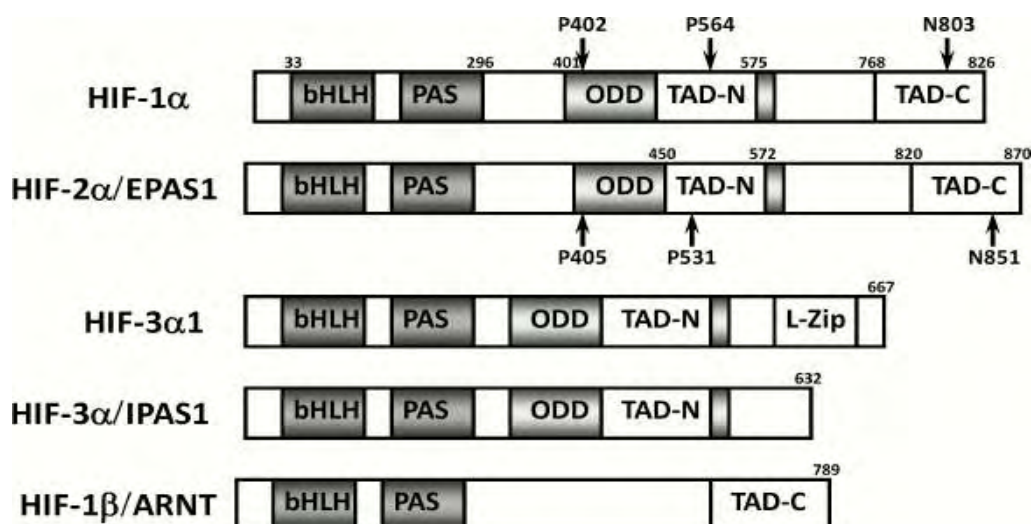
1.1.2 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΤΩΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF

1.1.2.1 Δομή

Οι HIF είναι πρωτεΐνες της οικογένειας bHLH/PAS, που σχηματίζουν πυρηνικά ετεροδιμερή και επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων της υποξίας. Το ετεροδιμερές συνίσταται από μια α-υπομονάδα που ρυθμίζεται από το οξυγόνο και από μια β-υπομονάδα που εκφράζεται σε

σταθερά επίπεδα. Στα κύτταρα των θηλαστικών τρία γονίδια εκφράζουν για τις ισομορφές της α -υπομονάδας HIF-1 α , HIF-2 α (EPAS1) και HIF-3 α (IPAS) (6-8). Η β -υπομονάδα αποτελείται από την πρωτεΐνη HIF-1 β ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator).

Τα μέλη της οικογένειας των HIF χαρακτηρίζονται από μια συντηρημένη κατανομή επικρατειών (Εικόνα 1). Συγκεκριμένα, οι τρεις ισομορφές HIF- α και ο HIF-1 β φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο επικράτειες βασικών αμινοξέων με βασική δομή έλικα-βρόγχο-έλικα (bHLH) για δέσμευση στο DNA, αλλά και PER-ARNT-SIM (PAS) επικράτειες με -A και -B υποπεριοχές, που ευθύνονται για την συγκρότηση του ετεροδιμερούς. Κεντρικά στις HIF- α υπομονάδες εντοπίζεται η επικράτεια οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODD). Η ιδιότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής οφείλεται στις επικράτειες TADs (Transactivation Domains) που εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο των HIF (9).



Εικόνα 1: Δομικές επικράτειες των μελών της οικογένειας HIF. Διακρίνονται οι συντηρημένες επικράτειες σύνδεσης στο DNA (bHLH), ετεροδιμερισμού (PAS), οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης (ODD) και ενεργοποίησης της μεταγραφής (N-TAD, C-TAD). Με βέλη σημειώνονται οι θέσεις υδροξυλίωσης από τις PHDs (P402 και P564 στον HIF-1 α και P405 και P531 στον HIF-2 α) ή τον παράγοντα FIH (N803 και N851 στους HIF-1 α και HIF-2 α αντίστοιχα) (10).

Οι bHLH και PAS επικράτειες παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των HIF. Συγκεκριμένα οι bHLH επικράτειες των HIF-1 α και HIF-2 α είναι κατά 85% ομόλογες ενώ οι αντίστοιχες PAS επικράτειες ταυτίζονται κατά 70%. Από την άλλη ο HIF-3 α διαφοροποιείται περισσότερο και οι bHLH και PAS επικράτειές του ταυτίζονται κατά 74% και 52-58% με αυτές των HIF-1 α και HIF-2 α αντίστοιχα (9).

Οι HIF-1α και HIF-2α παρουσιάζουν αυξημένη ομολογία και στην αμινοξική αλληλουχία και λειτουργία των επικρατειών οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης ODD και μεταγραφικής ενεργοποίησης TAD, φέροντας δύο υποπεριοχές TAD-N και TAD-C. Στις διάφορες ισομορφές του HIF-3α παρατηρείται απουσία της καρβοξυτελικής υποπεριοχής μεταγραφικής ενεργοποίησης TAD-C, η οποία στην ισομορφή HIF-3α1 έχει αντικατασταθεί από ένα μοτίβο φερμουάρ λευκίνης, ενώ η ισομορφή HIF-3α4 έχει απολέσει τις TADs (7, 11). Όπως αναλύεται στη συνέχεια οι δομικές ομοιότητες και διαφορές αντικατοπτρίζονται και στη λειτουργία των HIF.

1.1.2.2 Λειτουργία

Όπως ήδη περιγράφηκε, η μεταγραφική δράση των HIF εκδηλώνεται από ετεροδιμερή, των οποίων η HIF-1α υπομονάδα ρυθμίζεται από το οξυγόνο ενώ η HIF-1β εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα. Σε συνθήκες υποξίας ο HIF-1α σταθεροποιείται και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου και ετεροδιμερίζεται με την HIF-1β υπομονάδα (ARNT). Το σύμπλοκο δεσμεύει τους συμπράγοντες CBP/P300 στις TAD-C επικράτειες μεταγραφικής ενεργοποίησης και συνδέεται στις περιοχές των προαγωγέων ή των ενισχυτών γονιδίων στόχων και επάγει τη μεταγραφή τους. Οι αλληλουχίες DNA που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν οι HIF είναι τα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Responsive Elements). Πρόκειται για σύνθετα στοιχεία αποτελούμενα από ένα καλά συντηρημένο πυρήνα όπου συνδέεται ο HIF με αλληλουχία 5'-(A/G)CGTG-3' και υψηλής ποικιλότητας πλευρικές αλληλουχίες που ρυθμίζουν την μεταγραφική απόκριση (12).

Η ανακάλυψη των επαγόμενων από την υποξία παραγόντων έγινε σε μελέτες της επαγωγής, υπό συνθήκες υποξίας, της μεταγραφής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO), μιας γλυκοπρωτεΐνης που ρυθμίζει στα θηλαστικά την παραγωγή ερυθροκυττάρων (13). Η ερυθροποίηση είναι μια από τις κύριες αποκρίσεις στην υποξία σε επίπεδο οργανισμού. Βασική τοπική απόκριση στην ελλιπή οξυγόνωση σε επίπεδο ιστού αποτελεί η αγγειογένεση, με πληθώρα γονιδίων να αποτελούν στόχους των HIF και σημαντικότερο εκπρόσωπο τον παράγοντα αύξησης του αγγειακού ενδοθηλίου (Vascular Endothelium Growth Factor). Πέρα από τις αποκρίσεις που στοχεύουν στην αύξηση της πρόσληψης και της αξιοποίησης του οξυγόνου, οι HIF ρυθμίζουν τη μετατόπιση του μεταβολισμού από την οξειδωτική φωσφορυλίωση προς την αναερόβια γλυκόλυση. Γονίδια στόχοι των HIF κωδικοποιούν μεταξύ άλλων για μονομεταφορείς γλυκόζης (GLUT1) αλλά και για τα περισσότερα γλυκολυτικά ένζυμα (14). Εκτός από τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, οι παράγοντες HIF ρυθμίζουν και τον μεταβολισμό των λιπιδίων επάγοντας γονίδια στόχους που εκφράζουν ένζυμα όπως η λιπίνη-1 και συμβάλουν στην συσσώρευση τριγλυκεριδίων σε λιποσταγονίδια σε συνθήκες υποξίας (15,16).

Η δομική ομολογία των HIF-1α και HIF-2α έχει αντίκτυπο στη λειτουργία τους καθώς και οι δύο σταθεροποιούνται σε συνθήκες υποξίας, μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου διμερίζονται με τον ARNT και επάγουν τη μεταγραφή τόσο κοινών όσο και διαφορετικών γονιδίων στόχων (17). Ωστόσο, σε αντίθεση με τον HIF-1α που εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους, η έκφραση και δράση του HIF-2α είναι αρκετά ιστοειδική και εντοπίζεται κυρίως στο αγγειακό ενδοθήλιο κατά την εμβρυική ανάπτυξη και σε μια σειρά άλλων κυτταρικών τύπων (18, 19). Η τρίτη α-υπομονάδα HIF-3α όπως περιγράφηκε διαφοροποιείται αρκετά από τις δύο πρώτες. Εμφανίζει μεγάλη ποικιλία παραλλαγών που είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος και παρουσιάζουν διαφορετική μεταγραφική ενεργότητα, αλλά και διαφορετικές ιδιότητες ρύθμισης από το οξυγόνο και διμερισμού με τον ARNT. Η μορφή HIF-3α4 που όπως αναφέρθηκε δεν φέρει επικράτειες μεταγραφικής TADs, δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής του HIF-1α (11).

1.1.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ HIF ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Χαμηλά επίπεδα διαθέσιμου οξυγόνου (υποξία) παρατηρούνται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Συγκεκριμένα, οι HIF διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ποικίλες φυσιολογικές διεργασίες των θηλαστικών, όπως είναι η ανάπτυξη, ο μεταβολισμός, η ερυθροποίηση, η εγκαθίδρυση αγγειακών δικτύων, και η μορφογένεση.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αγγειακών δικτύων στα θηλαστικά, ο αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) που παράγεται σε κύτταρα που στερούνται οξυγόνου αποτελεί έναν σημαντικό διαμεσολαβητή της αγγειογένεσης. Όπως ο FGF (αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών) έτσι και ο VEGF αξιοποιείται κατά τη διάρκεια διαφόρων σταδίων της αγγειακής μορφογένεσης στα σπονδυλωτά. Ο FGF2 και ο VEGF αποτελούν άμεσους μεταγραφικούς στόχους των HIF (20).

Σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος των HIF στην ανάπτυξη του πλακούντα στα θηλαστικά. Η ανάπτυξη του πλακούντα στο πλαίσιο της εμβρυϊκής ανάπτυξης επηρεάζεται από τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης του O₂. Πριν την εμβρυονική μέρα 9,5, τα έμβρυα τρωκτικών βασίζονται στην αναερόβια γλυκόλυση για την παραγωγή ATP. Ωστόσο, η εγκαθίδρυση αγγειακών δικτύων την εμβρυονική μέρα 10,5-11,5 επιτρέπει τη μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Ποντίκια στα οποία πραγματοποιήθηκε απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τον ARNT, την VHL, την PHD2, ή συνδυαστικά των HIF-1α και HIF-2α έδειξαν ανωμαλίες στην αρχιτεκτονική του πλακούντα και στην αγγείωσή του, υποδεικνύοντας το ρόλο της διαβάθμισης του O₂ και των HIF στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης του πλακούντα (20).

Οι διαβαθμίσεις της συγκέντρωσης του οξυγόνου είναι σημαντικές παράμετροι για τη ρύθμιση της λιπογένεσης. Δεδομένου της αναγκαιότητας της μιτοχονδριακής αναπνοής για το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, η υποξία περιορίζει τη χρήση λιπαρών οξέων και την ανάγκη για επιπρόσθετο λιπώδη ιστό. Συγκεκριμένα, η υποξία αναστέλλει την ανάπτυξη των λιποκυττάρων από πρόδρομα μεσεγχυματικά, μέσω εξασθένησης της έκφρασης των PPAR γ υποδοχέων, οι οποίοι προωθούν τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε λιποκύτταρα (20).

Η παρατεταμένη υποξία σε ιστούς επάγει τη δραστικότητα των HIF σε κύτταρα σε όλο το σώμα, συμπεριλαμβανομένου εξειδικευμένων κυττάρων στους νεφρούς που παράγουν την ερυθροποιητίνη (EPO), μία ορμόνη (γλυκοπρωτεΐνη) η οποία εκκρίνεται στο αίμα και συνδέεται στους αντίστοιχους υποδοχείς σε πρόδρομα ερυθροειδή κύτταρα, οδηγώντας στη διέγερση της επιβίωσης και της διαφοροποίησής τους. Οι HIF ρυθμίζουν επίσης την ερυθροποίηση μέσω ρύθμισης της έκφρασης πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες υπεύθυνες για την πρόσληψη από το έντερο και τη μεταφορά του σιδήρου στο μυελό των οστών όπως επίσης και μέσω της ενεργοποίησης τη μεταγραφής του υποδοχέα της EPO (2).

1.1.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-1 α ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Οι συμπαγείς όγκοι χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ακανόνιστη, μη λειτουργική αγγειογένεση. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στη δημιουργία ενός υποξικού μικροπεριβάλλοντος που επάγει την σταθεροποίηση της υπομονάδας HIF-1 α . Με τη σειρά τους οι HIF, ενεργοποιώντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, ρυθμίζουν την προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στις συνθήκες έλλειψης οξυγόνου.

Συγκεκριμένα ο HIF-1, επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση (VEGF, ANGPT-2, iNOS) (21), και τη ρύθμιση του μεταβολισμού υπέρ της γλυκόλυσης (GLUT-1, HK2) (22), συμβάλλοντας στη παροχή οξυγόνου και την άμεση κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του αυξανόμενου όγκου. Πέρα από τη ρύθμιση της πρόσληψης και του μεταβολισμού της γλυκόζης, ο HIF-1 αναστέλλει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακετυλο-CoA, άρα την είσοδό του στον κύκλο του Krebs, καθώς επάγει τα επίπεδα της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (PDK-1). Ενώ, επάγοντας τα επίπεδα της LDH-A (Lactate Dehydrogenase A) προωθεί τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ (23). Έτσι μειώνεται η οξειδωτική φωσφορυλίωση και κατά συνέπεια μειώνονται η κατανάλωση μοριακού οξυγόνου και η παραγωγή ROS. Σε αυτό συμβάλλει και η αύξηση της αποδοτικότητας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, λόγω της αντικατάστασης του τέταρτου συμπλόκου που έχει δράση οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX4-1 σε COX4-2), στην οποία συμβάλλει η δράση

του HIF-1 (24). Η πρόσληψη γλυκόζης είναι πολύ αυξημένη στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά, ακόμα και σε συνθήκες όπου η οξειδωτική φωσφορυλίωση δε μεταβάλλεται. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ αυξάνει κατά πολύ το όξινο φορτίο του κυττάρου. Αυτό ρυθμίζεται από επαγόμενους από τον HIF-1 μεταφορείς (Mono Carboxylate Transporters MCTs) που εξάγουν το γαλακτικό οξύ με συμμεταφορά H^+ ρυθμίζοντας έτσι το pH τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον του (22). Ως αποτέλεσμα, το όξινο εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον είναι χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων.

Ο HIF-1 εμπλέκεται σε όλη τη βιολογία του καρκίνου και ο ρυθμιστικός του ρόλος έχει περιγραφεί, μεταξύ άλλων, στη διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των βλαστικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, τη δυνατότητα να διαφεύγουν από ανοσοποιητικό έλεγχο, την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή, τη μετάσταση και την ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία και ραδιοθεραπεία (25).

Όπως έχει ήδη περιγραφεί, ο HIF-1α σταθεροποιείται από την υποξία καθώς σταματάει η οξυγονοεξαρτώμενη αποικοδόμησή του, ενώ η έκφραση της πρωτεΐνης ρυθμίζεται από αυξητικούς παράγοντες που ενεργοποιούν τα μονοπάτια PI3K/AKT και MAPK. Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από συσσώρευση μεταλλάξεων που δρουν απορρυθμίζοντας τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν τον HIF-1α. Έτσι, η παραγωγή του παραμένει σε υψηλά επίπεδα και ανεξάρτητα από την παροχή οξυγόνου. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη VHL αναστέλουν την εξαρτώμενη από το οξυγόνο αποικοδόμηση των HIFα υπομονάδων, σχετίζονται με το νεφρικό καρκίνωμα και συνιστούν ξεχωριστό κληρονομικό καρκινικό σύνδρομο (26).

Η υπερέκφραση του HIF-1α στα καρκινικά κύτταρα επιβεβαιώνεται από πάρα πολλά κλινικά δεδομένα βιοψιών που προέρχονται από διάφορες μορφές ανθρώπινων όγκων. Τα υψηλά επίπεδα των HIF σε όγκους σχετίζονται με κακή πρόγνωση, αυξημένη πιθανότητα μετάστασης και υψηλή θνησιμότητα (12). Αν και δεν έχει επιτευχθεί άμεση στόχευση του HIF, κλινικές δοκιμές και πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι θα μπορούσε να έχει ελπιδοφόρα αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του καρκίνου, ενώ φάρμακα που δρουν έμμεσα, παρεμποδίζοντας μονοπάτια που επάγουν τους HIF έχουν ήδη μερική επιτυχία σε συγκεκριμένες μορφές καρκίνου (12). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πώς πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένας εξειδικευμένος ανταγωνιστής του HIF-2 (PT2399) ο οποίος αναπτύχθηκε μέσω της μεθόδου της κατευθυνόμενης από τη δομή μοριακού σχεδιασμού φαρμάκων και αναστέλλει τη δημιουργία του συμπλόκου με τον ARNT σε ανθρώπινο νεφρικό καρκίνωμα οδηγώντας σε καταστολή της ογκογένεσης σε ένα ποσοστό 56% (10/18) των αντίστοιχων κυτταρικών σειρών (27).

1.1.5 Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ HIF-1α

Ο HIF-1α είναι η πιο καλά μελετημένη α-υπομονάδα των HIF καθώς η έκφραση του είναι καθολική τόσο σε επίπεδο ζωικών οργανισμών, όσο και κυτταρικών τύπων. Επιπρόσθετα, η δράση του HIF-1 καλύπτει το σύνολο της κυτταρικής απόκρισης στη υποξία ρυθμίζοντας την αγγειογένεση, την ερυθροποίηση, τον κυτταρικό μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Από την άλλη ενέχεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, αποτελώντας δείκτη των συμπαγών όγκων και προωθώντας την επιβίωση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.

Η δράση του HIF-1 ρυθμίζεται από τον HIF-1α καθώς ο ARNT εκφράζεται σε σταθερά υψηλά επίπεδα. Ο HIF-1α είναι μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων που εκφράζεται συνεχώς και υπόκειται σε συνεχή ρύθμιση τόσο σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης (νορμοξία) όσο και σε υποξία. Η ρύθμιση του γίνεται σε επίπεδο μεταγραφής, έκφρασης, σταθεροποίησης και συσσώρευσης της πρωτεΐνης στον πυρήνα, όπου και ρυθμίζεται ο διμερισμός με τον ARNT, η πρόσδεση σε γονίδια στόχους και η αλληλεπίδραση με ποικίλους παράγοντες της μεταγραφής. Μέρος αυτών των ρυθμίσεων, όπως οι οξυγονοεξαρτώμενες ρυθμίσεις, αλλά και κάποιες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις έχουν καθολικό χαρακτήρα και τελούνται σε όλα τα κύτταρα που εκφράζουν τους HIF. Από την άλλη ρυθμίσεις όπως αυτές της μεταγραφής και της μετάφρασης του γονιδίου του HIF-1α διαφοροποιούνται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τον οργανισμό.

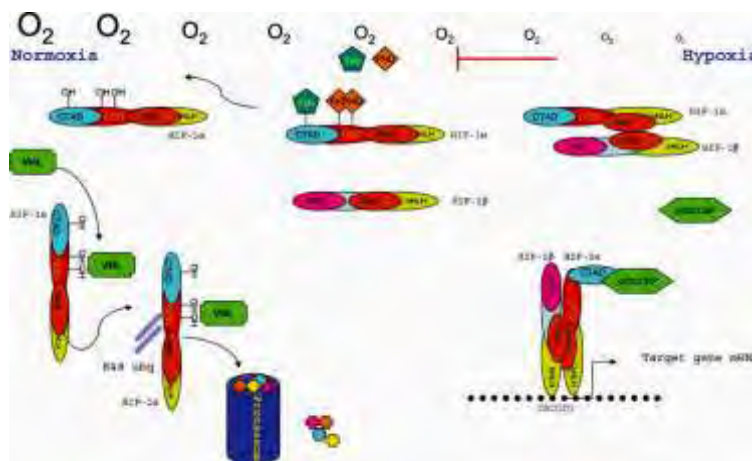
1.1.5.1 Οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α

Η κυριότερη ρύθμιση στην οποία υπόκειται ο HIF-1α βρίσκεται σε άμεση συσχέτιση με τα επίπεδα οξυγόνωσης του κυττάρου ή ιστού. Σε συνθήκες νορμοξίας ο HIF-1α συντίθεται συνεχώς και αποικοδομείται στο κυτταρόπλασμα. Συγκεκριμένα, υδροξυλίωση του HIF-1α σε δύο κατάλοιπα προλίνης (Pro 402 και 564) εντός της επικράτειας οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης ODD, έχει σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση και δέσμευσή του από την πρωτεΐνη Von Hippel-Lidau (VHL). Ο παράγοντας αυτός αποτελεί συστατικό του συμπλέγματος E3 λιγάσης-ουβικιτίνης, έτσι ο HIF-1α πολύ-ουβικιτινιώνεται και οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα 26S (28).

Η αρχική υδροξυλίωση καταλύεται από μια τάξη ενζύμων που ονομάζονται προλυλο-υδροξυλάσες (prolyl-hydroxylases, PHDs). Οι PHDs ανήκουν στην οικογένεια των διοξυγενασών και χρειάζονται δισθενή σίδηρο Fe^{+2} και α-κετογλουταρικό σαν συμπαραγόντες για την ενζυμική τους δράση καθώς και μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα. Συνεπώς, σε συνθήκες υποξίας το μοριακό οξυγόνο εκλείπει από τα υποστρώματα των PHDs, καθιστώντας τις PHDs ανενεργές. Έτσι ο HIF-1α σταθεροποιείται και εισάγεται στον πυρήνα, όπου διμερίζεται με τον ARNT και επάγει την έκφραση γονιδίων στόχων (29). Μάλιστα η PHD2 φαίνεται να είναι ο

κύριος ρυθμιστής του HIF-1α, όπως έχει ελεγχθεί με πειράματα αποσιώπησης, ενώ ο υποκινητής του γονιδίου της φέρει ένα HIF-1 εξαρτώμενο HRE, δημιουργώντας έτσι έναν πιθανό έλεγχο αρνητικής ανατροφοδότησης (28).

Πέρα από την οξυγονοεξαρτώμενη αποικοδόμηση, ένας ακόμη μηχανισμός υδροξυλίωσης αναστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Ο παράγοντας FIH (Factor Inhibiting HIF) υδροξυλιώνει μια ασπαραγίνη (Asn-803) εντός της καρβοξυτελικής επικράτειας μεταγραφικής ενεργοποίησης C-TAD, αποτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση του HIF-1α με συμπαραγόντες της μεταγραφής (30). Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση του HIF-1α με το σύμπλοκο CBP/p300 είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής, κυρίως λόγω της ενεργότητας ακετυλ-τρανσφεράσης του τελευταίου που κάνει δυνατή τη τοπική τροποποίηση της χρωματίνης, ενώ έχει βρεθεί ότι μέσω της CBP αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α και άλλοι σημαντικοί συμπαραγόντες της μεταγραφής, όπως η SRC-1 (31).



Εικόνα 2: Η οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α. Σε συνθήκες νορμοξίας υδροξυλιώνεται από τις πρόλυλο-υδροξυλάσες στην ODD, πολυουβικιτινιώνεται από τον VHL και αποικοδομείται στο 26S πρωτεάσωμα. Σε συνθήκες νορμοξίας αλλά και μειωμένου οξυγόνου η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α αναστέλλεται από τον παράγοντα FIH που υδροξυλιώνει μια ασπαραγίνη στη C-TAD και αποτρέπει τη σύνδεση των συμπαραγόντων της μεταγραφής CBP/p300. Σε συνθήκες υποξίας ο HIF-1α σταθεροποιείται και είναι μεταγραφικά ενεργός (32).

Παρόλο που και ο FIH, όπως οι PHDs, ανήκει στην οικογένεια των διοξυγενασών που χρειάζονται Fe^{+2} και α-κετογλουταρικό σαν συμπαραγόντες και μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα, τα δύο ένζυμα διαφέρουν σημαντικά. Ο παράγοντας FIH παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για το μοριακό οξυγόνο από τις PHDs με αποτέλεσμα να παραμένει ενεργός και σε συνθήκες σχετικά χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Έτσι ρυθμίζει την μεταγραφική ενεργότητα και σε συνθήκες όπου ο HIF-1α σταθεροποιείται (33).

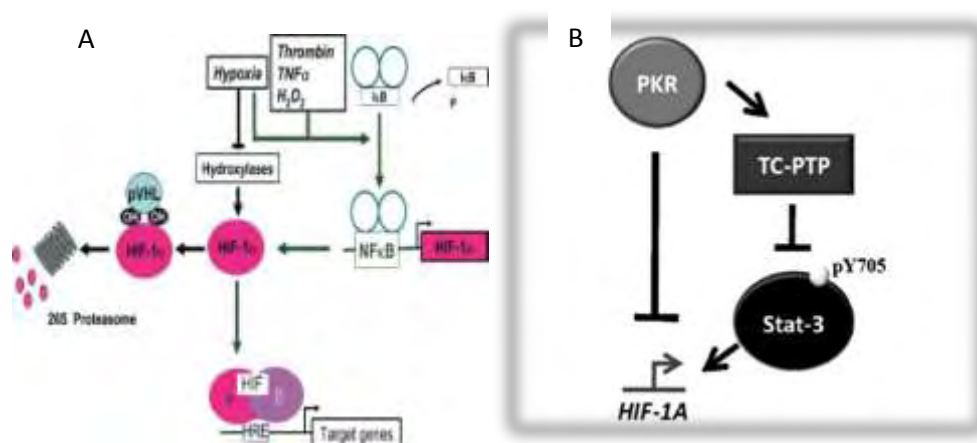
1.1.5.2 Μη οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α

1.1.5.2.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Είναι πλέον επιστημονικά τεκμηριωμένη η αύξηση της έκφρασης του HIF-1α σε συνθήκες νορμοξίας σε απόκριση αυξητικών παραγόντων, θρομβίνης, LPS (Lipopolysaccharide), αγγειοτενσίνης II, κυτοκινών ή TNF-α ή ινσουλίνης. Επιπρόσθετα οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) συμμετέχουν στις περισσότερες από αυτές τις αποκρίσεις, υποδεικνύοντας ότι ο HIF-1 μπορεί να δρα σαν ένας μεταγραφικός παράγοντας-αισθητήρας της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου. Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF-kB ταυτοποιήθηκε ως πρωταρχική κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων-αισθητήρων οξειδοαναγωγικού δυναμικού που διαμεσολαβούν συγκεκριμένες φλεγμονώδεις αποκρίσεις σε μια πληθώρα διαταραχών (34).

Πιθανή διασταρούμενη επικοινωνία των μονοπατιών του NF-kB και των μονοπατιών των HIF έχει δειχθεί εκτενώς σε επίπεδο πρωτεΐνης σε απόκριση στον TNF-α. Επίσης η ενεργοποίηση του NF-kB συσχετίστηκε με αυξημένα βασικά επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του HIF-1α. Επίσης αποδείχθηκε η ύπαρξη μιας αλληλουχίας συναίνεσης για τον NF-kB στον υποκινητή του γονιδίου του HIF-1α (-197/-188 bp από το σημείο έναρξης της μεταγραφής). Μετάλλαξη αυτής της περιοχής αναίρεσε τις προαναφερθείσες αποκρίσεις, επιβεβαιώνοντας ότι αυτή η περιοχή είναι λειτουργική και υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο ένα σημαντικό σύνδεσμο μεταξύ της ενεργοποίησης της φλεγμονώδους απόκρισης και του μονοπατιού απόκρισης στην υποξία. Επίσης, βρέθηκε ότι αυτή η περιοχή πρόσδεσης του NF-kB στον υποκινητή του γονιδίου του HIF-1α είναι συντηρημένη μεταξύ διαφορετικών ειδών (34) (*Εικόνα 3A*).

Επιπλέον, τη μεταγραφή του γονιδίου HIF-1α έχει βρεθεί ότι επάγει, σε καρκινικά κύτταρα, ο μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3 (Stat3) (35), ενώ η αναστολή του Stat3 από την, εξαρτώμενη από το δίκλωνο RNA, κίνηση του eIF-2α PKR βρέθηκε ότι ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφή του HIF-1α γονιδίου (36) (*Εικόνα 3B*).

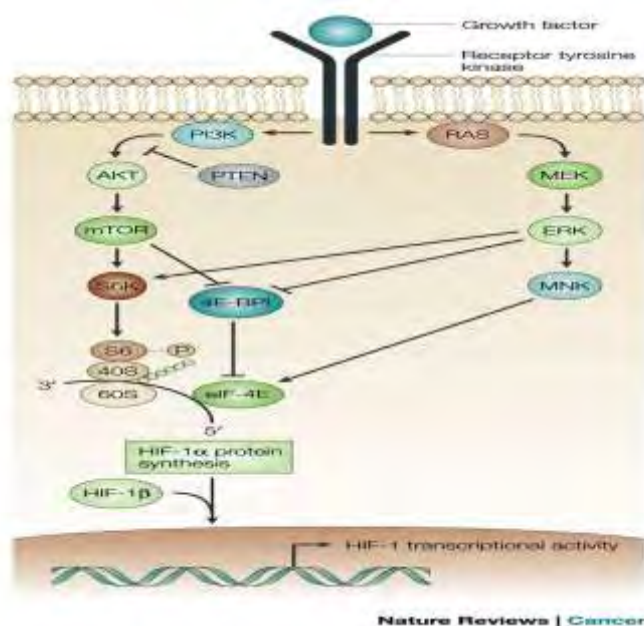


Εικόνα 3: Α) Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου *HIF-1A* από τον *NF-κB* (Gorlach *et al.*, 2008). Β) Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου *HIF-1A* από την *PKR* μέσω της ανασταλτικής φωσφορυλίωσης του *Stat3* (36).

1.1.5.2.2 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης

Η διέγερση της σύνθεσης του HIF-1α είναι ιστοειδική και εξαρτάται από τη δράση σηματοδοτικών μορίων, όπως οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες, που ενεργοποιούν μονοπάτια που επάγουν την κυτταρική αύξηση και την πρωτεϊνοσύνθεση και συγκεκριμένα τα μονοπάτια της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και των κινασών ERK (extracellular signal-regulated kinases) (Εικόνα 4).

Οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, οι οποίοι με τη σειρά του ενεργοποιούν την PI3K και τις ERK. Η PI3K ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT (επίσης γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση B, PKB) και την πρωτεΐνη mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Στο μονοπάτι των ERK, οι ERK έχουν ενεργοποιηθεί από τις MEK (MAPK/ERK Kinase) και ενεργοποιούν με τη σειρά τους τις MNK (MAPK interacting protein kinases). Η ERK και η mTOR φωσφορυλιώνουν την p70 S6 κινάση (S6K), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη και την πρωτεΐνη που προσδένεται στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (4E-BP1). Η πρόσδεση του 4E-BP1 στον eIF-4E παρεμποδίζεται από τη φωσφορυλίωση του από τις mTOR και ERK έχοντας σαν αποτέλεσμα τη μετάφραση των mRNA με 5' καλύπτρα. Επίσης οι MNK φωσφορυλιώνουν τον eIF-4E και διεγείρουν άμεσα τη δράση του. Το αποτέλεσμα του μονοπατιού αυτού είναι η αυξημένη μετάφραση μιας ομάδας συγκεκριμένων mRNA στα οποία συμπεριλαμβάνεται και ο HIF-1α (37).



Εικόνα 4: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη διέγερση της σύνθεσης του HIF-1α. Ανατύπωση από: *nature.com* (37)

1.1.5.2.3 Αλληλεπίδραση του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες

Όπως έχειδειχθεί τόσο η σταθερότητα όσο και η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α ρυθμίζεται μέσω αλληλεπιδράσεων του με πολλές άλλες πρωτεΐνες (38), μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται οι Hsp90/RACK1, MgcRacGap, p53 και Myc.

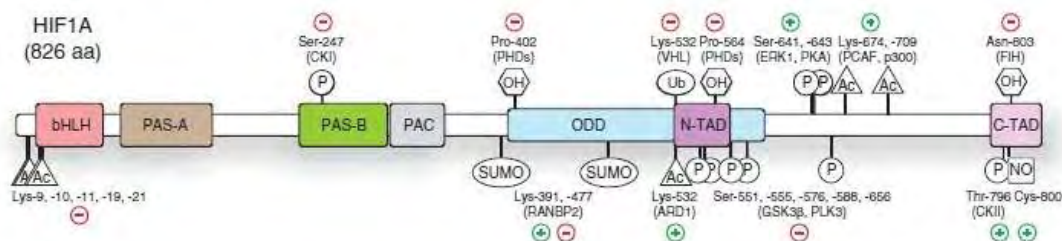
Μελέτες έδειξαν την in-vitro αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον υποδοχέα της ενεργοποιημένης protein C κινάσης (RACK1). Βρέθηκε ότι η RACK1 ανταγωνίζεται την Hsp90 (αποτρέπει την αποικοδόμηση του HIF-1α μέσω πρωτεασώματος ανεξάρτητα του VHL) για μια θέση δέσμευσης με τον HIF-1α εντός της PAS-A επικράτειας του τελευταίου και επάγει την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα προσδένοντας ένα διαφορετικό του VHL σύμπλοκο E3 λιγάσης, σε συνθήκες υποξίας και νορμοξίας (39).

1.1.5.2.4 Ρύθμιση από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Η ρύθμιση του HIF-1α μετα-μεταφραστικά περιλαμβάνει προσθήκη λειτουργικών ομάδων από τα κατάλληλα ένζυμα (Εικόνα 5). Οι τροποποιήσεις αυτές ρυθμίζουν την σταθερότητα, τον υποκυτταρικό εντοπισμό, αλλά και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Οι τροποποιήσεις αυτές αφορούν: α) ακετυλίωση (40): σε πρόσφατες μελέτες αποδείχθηκε ότι η ακετυλίωση του HIF-1α στο καρβοξυτελικό άκρο (Lys-674, Lys-709) αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης και επάγει την μεταγραφή γονιδίων στόχων. Ακετυλίωση από τον παράγοντα που σχετίζεται με το σύμπλοκο CBP/p300 (PCAF) στη Lys-674 επάγει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τις CBP/p300 (41), ενώ η ακετυλίωση στη Lys-709 γίνεται από την p300 και σταθεροποιεί τον HIF-1α ανταγωνιζόμενη πιθανή πολυουβικιτινίωσή του στην ίδια θέση (42), β) S-νιτροσυλίωση, γ)

Σουμοϋλίωση και δ) Φωσφορυλίωση. Όσον αφορά το τελευταίο είδος μετα-μεταφραστικής τροποποίησης έχει αποδειχθεί ότι: από τον αρχικό χαρακτηρισμό του HIF-1α ως φωσφοπρωτεΐνη (43), έχουν ανακαλυφθεί πολλές θέσεις και μηχανισμοί φωσφορυλίωσης που ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά τη δράση του. Ένας θετικός ρυθμιστής του HIF-1α είναι η κινάση σερίνης/θρεονίνης CK2 (Casein Kinase 2), αναστολή της οποίας οδηγεί σε μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 (44). Ταυτοποιήθηκε μια θέση φωσφορυλίωσης από την CK2 στο καρβοξυτελικό άκρο του HIF-1α (Thr-796) που βρίσκεται εντός της C-TAD. Η φωσφορυλίωση στη θέση αυτή, επάγει τη δράση του HIF-1α παρεμποδίζοντας την ανασταλτική υδροξυλίωση του HIF-1α από την υδροξυλάση FIH (45). Τη σταθεροποίηση του HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, φαίνεται να προάγει και η δράση της κινάσης ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) που φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στη Ser-696. Η ATM κινάση επάγεται σε συνθήκες υποξικού στρες και η δράση της στοχεύει στην απορρύθμιση του mTORC1 μέσω της ελεγχόμενης από τον HIF-1 επαγωγής γονιδίων στόχων (46).

Από την άλλη, έχουν ταυτοποιηθεί τρία αμινοξικά κατάλοιπα εντός της N-TAD του HIF-1α, φωσφορυλίωση των οποίων δρα αποσταθεροποιητικά για την πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3 (GSK-3) φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στα αμινοξέα Ser-551, Thr-555 και Ser-589 προωθώντας την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από το οξυγόνο και τον pVHL (47). Μια ακόμα φωσφορυλίωση, από την Plk3 (Polo-like-kinase 3) στα αμινοξικά κατάλοιπα Ser-576 και Ser-657, φαίνεται να αποσταθεροποιεί επίσης τον HIF-1α (48). Επιπλέον, εκτός από τις επικράτειες μεταγραφικής ενεργοποίησης και οξυγονοεξαρτώμενης αποικοδόμησης, αμινοξικά κατάλοιπα που αποτελούν θέσεις φωσφορυλίωσης του HIF-1α ταυτοποιήθηκαν και εντός της PAS-B επικράτειας διμερισμού με τον ARNT. Βρέθηκε ότι η κινάση της καζεΐνης 1δ (CK1δ) φωσφορυλιώνει την Ser-247, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η συγκρότηση ενεργού συμπλόκου με τον ARNT (49). Έτσι, μειώνεται η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 με αποτέλεσμα να ελλατώνεται η συγκέντρωση της λιπίνης-1 και η συσσώρευση λιποσταγονιδίων σε συνθήκες υποξίας (15). Επίσης, ο HIF-1α ρυθμίζεται από τις εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες Cdk1 και Cdk2. Έχει ταυτοποιηθεί ένα κατάλοιπο φωσφορυλίωσης από την Cdk1 στη Ser-668 που προτάθηκε ότι αποτρέπει την αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα (50). Ωστόσο, πιο πρόσφατες έρευνες συσχετίζουν τη φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις Cdk1 και Cdk2 με σταθεροποίηση ή αντίστοιχα αποικοδόμηση της πρωτεΐνης στα λυσοσώματα και όχι στο πρωτεάσωμα (51). Πρόσφατα, δείχθηκε ότι η PKA τροποποιεί τον HIF-1α και αυξάνει τόσο την σταθερότητα του όσο και την μεταγραφική του ενεργότητα επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση του με τον συμπαράγοντα p300 (52).



Εικόνα 5: Αναπαράσταση της δομής του HIF-1α με ενδείξεις για τις θέσεις διαφόρων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, των ενζύμων που τις καταλύουν και του θετικού ή αρνητικού ρόλου της τροποποίησης στη λειτουργικότητα του HIF-1α (9).

1.1.5.2.5 Ρύθμιση της μεταφοράς του HIF-1α στον πυρήνα

Βασικό στάδιο για τη δράση κάθε μεταγραφικού παράγοντα είναι η εισαγωγή του στον πυρήνα. Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς αυτής ρυθμίζεται από την ισχύ των σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που διαθέτει και από την διαθεσιμότητα των ιμφορτινών που είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά. Έχουν εντοπιστεί δύο κλασικά διμερή σήματα πυρηνικού εντοπισμού στην αμινοξική αλληλουχία του HIF-1α. Το ένα στην αμινοτελική περιοχή (αμινοξέα 17-74) και το δεύτερο στην καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 718-756), αλλά πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι μόνο το καρβοξυτελικό NLS είναι λειτουργικό. Τα κλασικά σήματα πυρηνικού εντοπισμού συνήθως συνδέονται με μια ιμφορτίνη α και μέσω αυτής στην ιμφορτίνη β, που εκτελεί τη μεταφορά. Βρέθηκε ότι στο καρβοξυτελικό NLS του HIF-1α συνδέονται τέσσερις ισομορφές των ιμφορτινών α (α1, α3, α5 και α7). Η πληθώρα αυτή των διαθέσιμων ιμφορτινών δείχνει τη σημασία της αποτελεσματικής εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα για την άμεση ρύθμιση της απόκρισης στην υποξία (53).

Προσθέτοντας στο πλουραλισμό εισόδου του HIF-1α στον πυρήνα, πειραματικά δεδομένα από το Εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Π.Θ., έδειξαν ότι απενεργοποίηση του διμερούς καρβοξυτελικού NLS, δεν αποτρέπει την μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα. Βρέθηκε ότι οι ιμφορτίνες 4 και 7 αναγνωρίζουν ένα νέο μη κλασικό, αλλά λειτουργικό, NLS στο αμινοτελικό άκρο του HIF-1α (αμινοξέα 1-251) που δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως (54).

1.1.5.2.6 Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α ΑΠΟ ΤΙΣ ERK1/2

Ένας από τους σημαντικότερους και περισσότερο μελετημένους μηχανισμούς ρύθμισης του HIF-1α αφορά την άμεση φωσφορύλωση του από τις κινάσες ERK1/2. Το μονοπάτι που ενεργοποιεί τις ERK κινητοποιείται φυσιολογικά από παράγοντες αύξησης, κυτοκίνες και άλλα

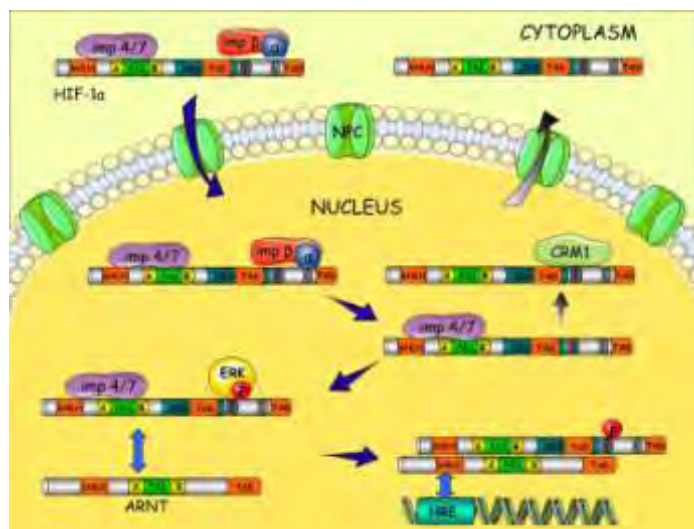
σηματοδοτικά μόρια ορισμένα εκ των οποίων έχει βρεθεί ότι επάγονται σε συνθήκες υποξίας. Επιπλέον λόγω της απορρύθμισης των ογκογονιδίων όπως τα c-Ras και c-Raf οι ERK είναι συνεχώς ενεργές σε πολλούς τύπους καρκίνου (55). Αν και οι MAPK επάγουν το μονοπάτι της πρωτεϊνοσύνθεσης και, έτσι, τον HIF-1α, η απευθείας φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK1/2 παίζει κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφικής του ενεργότητας όπως έχει δειχθεί με την χρήση ειδικών αναστολέων των MEK (PD98059 και U0126).

Από τις πρώτες μελέτες που χαρακτήρισαν τον HIF-1α ως φωσφοπρωτεΐνη είχε δειχθεί ότι φωσφορυλιώνεται *in vivo* από τις MAP κινάσες και συγκεκριμένα από τις p42/p44 MAPK (ERK1/2) και όχι από τις p38 MAPK και c-Jun N-τελική κινάση (56). Παλαιότερα αποτελέσματα του Εργαστηρίου Βιοχημείας αποκάλυψαν δύο αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης (Ser-641 και Ser-643) ως θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 (57). Σημειακές μεταλλάξεις των θέσεων αυτών (σερίνη-641 και σερίνη-643 σε αλανίνη, SA) ή προσθήκη του αναστολέα PD98059 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της συσσώρευσης του HIF-1α στον πυρήνα και κατά συνέπεια τη μειωμένη δράση του ως μεταγραφικού παράγοντα. Σε κύτταρα που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη μορφή του HIF-1α SA, η οποία εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, η προσθήκη της Leptomycin B (LMB), που αναστέλλει τη δράση της γενικής εξαπορτίνης των θηλαστικών CRM-1 (exportin 1), είχε σαν αποτέλεσμα η μεταλλαγμένη SA μορφή να συσσωρευθεί στον πυρήνα και να ανακτήσει, μερικά, τη μεταγραφική ενεργότητα σε σχέση με την αγρίου τύπου μορφή. Έτσι προτάθηκε ότι η απουσία φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2 αναστέλλει την πυρηνική συσσώρευση του HIF-1α μέσω της εξαγωγής του στο κυτταρόπλασμα (57).

Σε επόμενο στάδιο επιτεύχθηκε ο χαρακτηρισμός ενός υδρόφοβου NES (632-MEDIKILI-639) γειτονικά στις σερίνες 641/643 που τροποποιούνται από τις ERK1/2. Φωσφομιμητική μετάλλαξη (σερίνη-641 σε γλουταμινικό, SE), έδωσε ανθεκτικό στην αναστολή από τις ERK1/2 φαινότυπο, με υψηλή πυρηνική συγκέντρωση και μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Επιπλέον, οι μορφές του HIF-1α όπου έχουν μεταλλαχθεί τόσο το NES όσο και οι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK, ανέκτησαν τις ιδιότητες της αγρίου τύπου μορφής του HIF-1α όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό και την ενεργότητα (58).

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησαν στο παρακάτω μοντέλο ρύθμισης του HIF-1α από τις ERK1/2 (Εικόνα 6). Σύμφωνα με αυτό, προτείνεται, ότι μετά τη σταθεροποίησή του, ο HIF-1α, αλληλεπιδρά με τις ιμφορτίνες και εισάγεται στον πυρήνα. Εκεί, αν το μονοπάτι των ERK είναι ενεργό, όπως παρατηρείται σε έντονα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, τότε οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α στις σερίνες 641 και 643 και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απόκρυψη ενός εξαρτώμενου από την CRM1 σήματος πυρηνικής εξαγωγής. Έτσι ο HIF-1α

συσσωρεύεται στον πυρήνα όπου ετεροδιμερίζεται με τον ARNT και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Αντίθετα, εάν το μονοπάτι των ERK είναι ανενεργό, τότε η CRM1 προσδένεται στο NES και εξάγει τον HIF-1α στο κυτταρόπλασμα, διατηρώντας έτσι τη συγκέντρωση του στον πυρήνα και τη μεταγραφική του ενεργότητα σε χαμηλά επίπεδα (Εικόνα 6).



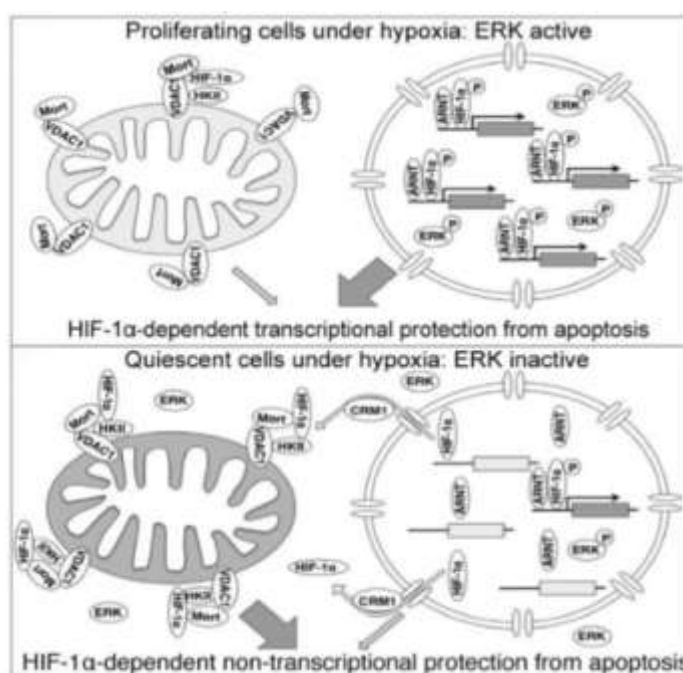
Εικόνα 6: Προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης του HIF-1α από τις ERK1/2. Ο HIF-1α σταθεροποιείται και εισάγεται στον πυρήνα, όπου, αλληλεπιδρά με την CRM1 και εξάγεται στο κυτταρόπλασμα. Παράλληλη ενεργοποίηση των ERK1/2, έχει σαν αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση του, την απόκρυψη του NES και την συσσώρευση του στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους της υποξίας (59).

1.1.6 HIF-1α ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Όταν κατά τη υποξία ανασταλεί η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις κινάσες ERK1/2, ο ενδογενής HIF-1α μετακινείται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου οδηγεί σε μη-γενωμική αναστολή της απόπτωσης, δημιουργώντας έναν ιδιαίτερο προσαρμοστικό μηχανισμό που συμβάλλει στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην υποξία (60).

Συγκεκριμένα, η μελέτη έδειξε ότι ο HIF-1α μπορεί με άμεσο τρόπο να οδηγεί σε αναστολή της απόπτωσης προσδενόμενος σε πρωτεΐνες της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ειδικότερα, η φωσφορυλίωση από τις ERK ρυθμίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με έναν «μοριακό παρτενέρ» που είναι η πρωτεΐνη GRP75 ή αλλιώς μορταλίνη. Η μορταλίνη διαμεσολαβεί τη μη-γενωμική συμμετοχή του HIF-1α στην απόπτωση. Σε συνθήκες που ευνοούν την αναστολή των κινασών ERK, ο ενδογενής HIF-1α παρουσιάζει κυτταροπλασματικό εντοπισμό. Στο κυτταρόπλασμα ο HIF-1α αλληλεπιδρά με τη μορταλίνη μέσω της οποίας διαμεσολαβείται η μετατόπιση του στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου και σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες εξοκινάση 2 και τον διάυλο ανιόντων VDAC1.

Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η αναστολή της απόπτωσης (60). Η υπερέκφραση μεταλλαγμένων μορφών της περιοχής που στοχεύεται από τις ERK (ETD-SA) και περιέχει τη θέση αλληλεπίδρασης με τη μορταλίνη και στόχευσης στα μιτοχόνδρια, είχε ως αποτέλεσμα το συναγωνισμό του ενδογενούς HIF-1α για την πρόσδεση στη μορταλίνη και την απομάκρυνση του HIF-1α από μιτοχόνδρια (60), προκαλώντας την έναρξη της απόπτωσης σε συνθήκες αναστολής των κινάσων ERK. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και σε νορμοξικές συνθήκες, καθώς η υπερέκφραση μεταγραφικά ανενεργών μορφών του μη τροποποιημένου από τις ERK HIF-1α οδήγησε σε αυξημένη ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων στην επαγόμενη από ετοποσίδιο ή δοξορουβικίνη απόπτωση.



Εικόνα 7: Συγκριτική αναπαράσταση μεταγραφικής και μη μεταγραφικής εμπλοκής του HIF-1α στην αναστολή της απόπτωσης σε συνθήκες όπου οι κινάσες ERK είναι ενεργές και ανεσταλμένες, αντίστοιχα (60).

Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με προηγούμενες μελέτες οδήγησαν στο να προταθούν τα μοντέλα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 7. Όταν οι κινάσες ERK είναι καταλυτικά ενεργές (π.χ. σε ταχέως διαιρούμενα και αναπτυσσόμενα κύτταρα) φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α στις σερίνες 641 και 643 που εντοπίζονται κοντά στο NES, γεγονός που εμποδίζει την εξαρτώμενη από την CRM-1 εξαγωγή του HIF-1α από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Ως εκ τούτου, δημιουργείται το διμερές HIF-1α/ARNT που ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων στόχων της υποξίας προσδεδεμένο σε κατάλληλα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HRE) στους υποκινητές των αντίστοιχων γονιδίων. Μεταξύ αυτών των γονιδίων-στόχων συμπεριλαμβάνονται και γονίδια που συμμετέχουν στη ρύθμιση της απόπτωσης. Οι συνέπειες της μεταγραφικής δραστηριότητας των παραγόντων HIF στην απόπτωση είναι αρκετά περίπλοκες, δεδομένου του

γεγονότος ότι υπάρχουν αντικρουόμενες βιβλιογραφικές αναφορές που προτείνουν ότι ο HIF-1α μπορεί να επάγει καθώς και να αναστέλλει την απόπτωση (61). Μέρος αυτής της πολυπλοκότητας οφείλεται στην ύπαρξη τριών διαφορετικών υπομονάδων HIF-α στα θηλαστικά. Ανάλογα και με τον κυτταρικό τύπο οι διαφορετικές υπομονάδες των HIF μπορούν να έχουν αλληλεπικαλυπτόμενες ή τελείως ανταγωνιστικές δράσεις. Οι HIF-α υπομονάδες εμπλέκονται στη ρύθμιση μιας ποικιλίας μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών με προαποπτωτικές ή αντιαποπτωτικές επιδράσεις. Η σημασία αυτών των ρυθμιστικών επιδράσεων εξαρτάται και από την εκάστοτε κατάσταση στην οποία βρίσκεται το κύτταρο. Ο HIF-1α μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της έκφρασης της Bcl-2, επαγωγή της έκφρασης της BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19 kD-interacting protein 3) (62), της ομόλογης πρωτεΐνης Nip-3-like protein 3 και της πρωτεΐνης Noxa. Οι τελευταίες πρωτεΐνες έχουν προ-αποπτωτική δράση. Σε αντίθεση, μια πληθώρα αποδείξεων προτείνει ότι ο HIF-1α μπορεί επίσης να προστατεύσει από την επαγωγή του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Αντι-αποπτωτικές δράσεις περιλαμβάνουν αύξηση της έκφρασης της Bcl-2, της Mcl-1, της Bcl-xL (μέσω πρόσδεσης του HIF-1α στα αντίστοιχα HRE στους υποκινητές των αντίστοιχων γονιδίων) και μείωση της έκφρασης των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Bid, Bax και Bak (61).

Όταν σε συνθήκες υποξίας οι κινάσες ERK είναι ανενεργές (π.χ. σε μη διαιρούμενα κύτταρα), ο μη φωσφορυλιωμένος HIF-1α αναγνωρίζεται από την εξπορτίνη CRM1 και μεταβαίνει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου αλληλεπιδρά μέσω της περιοχής ETD (αμινοξέα 616-658) με τη μορταλίνη και μέσω αυτής συνδέεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου αλληλεπιδρά με δύο άλλες πρωτεΐνες, την εξοκινάση 2 και το διάυλο ανιόντων VDAC, γεγονός που οδηγεί σε αναστολή της έναρξης της απόπτωσης (60). Η αντιαποπτωτική αυτή δράση του HIF-1α απαιτεί τη παρουσία περιοχών στο καρβοξυτελικό του άκρο που βρίσκονται εκτός της ETD. Οι περιοχές αυτές (αμινοξικές αλληλουχίες 348-616 και 658-826) είναι πιθανόν να διαμεσολαβούν την αλληλεπίδραση του HIF-1α με αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, η ταυτότητα των οποίων όμως είναι άγνωστη.

1.2 ΓΕΝΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ

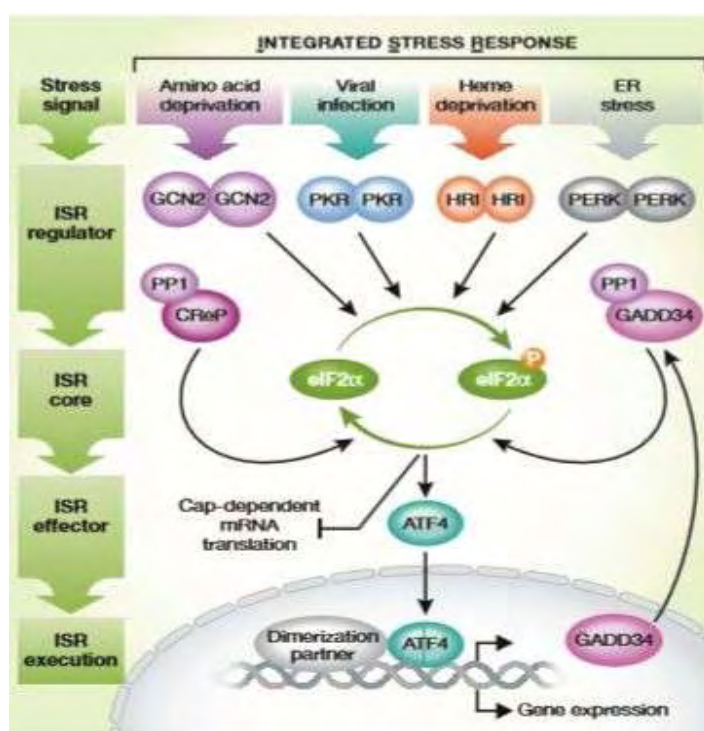
1.2.1 ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΟ ΣΤΡΕΣ: ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Το σύστημα ολοκληρωμένης απόκρισης στο στρες (ISR: Integrated Stress Response) είναι ένα περίπλοκο σηματοδοτικό σύστημα που λειτουργεί στα ευκαρυωτικά κύτταρα και ενεργοποιείται σε απόκριση μιας πληθώρας φυσιολογικών αλλαγών, αλλά και παθολογικών καταστάσεων. Τέτοιου είδους στρεσογόνα ερεθίσματα συνήθως περιλαμβάνουν εξωγενείς παράγοντες όπως είναι η στέρηση αμινοξέων, η στέρηση γλυκόζης και η ιϊκή λοίμωξη. Το κοινό σημείο σύγκλισης για όλα τα στρεσογόνα ερεθίσματα που ενεργοποιούν το ISR είναι η φωσφορυλίωση της άλφα-υπομονάδας του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης 2 (eIF2α) στη σερίνη 51. Σε κύτταρα θηλαστικών, η φωσφορυλίωση αυτή καταλύεται από μία οικογένεια τεσσάρων κινάσων σερίνης/θρεονίνης η καθεμία από τις οποίες είναι εξειδικευμένη στην απόκριση σε ένα εξωγενές στρεσογόνο ερέθισμα. Η φωσφορυλίωση του eIF2α οδηγεί σε καθολική παύση της πρωτεϊνσύνθεσης, ενώ παράλληλα επιτρέπεται η μετάφραση επιλεγμένων μεταγράφων, όπως αυτό του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό παράγοντα ATF4. Και τα δύο προαναφερθέντα γεγονότα συμβάλλουν στην κυτταρική επιβίωση και ανάκαμψη. Ωστόσο, εάν το στρεσογόνο ερέθισμα είναι μεγάλης διάρκειας και έντασης, ξεπερνάει την προσαρμοστική ικανότητα του κυττάρου να εξουδετερώσει το στρες με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μοριακών μηχανισμών που θα οδηγήσουν το κύτταρο σε θάνατο. Τέλος, η αποφωσφορυλίωση του eIF2α σηματοδοτεί την απενεργοποίηση του κυκλώματος ISR και την επαναφορά της πρωτεϊνσύνθεσης. Ουσιαστικά είναι η διάρκεια και τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του eIF2α, όπως επίσης και η ρύθμιση του ATF4 και η αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες που καθορίζουν την τελική έκβαση του συστήματος ISR, όσον αφορά την επιλογή ανάμεσα σε επιβίωση ή κυτταρικό θάνατο. Επίσης πολύ σημαντικό είναι ότι η φωσφορυλίωση του eIF2α οδηγεί στο σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες για τα οποία θα γίνει εκτενής λόγος στη συνέχεια (63).

1.2.1.1 Στάδια του συστήματος ολοκληρωμένης απόκρισης στο στρες

Η παρουσία συγκεκριμένων στρεσογόνων ερεθισμάτων όπως στέρηση αμινοξέων, ιϊκή λοίμωξη, στέρηση αίμης και στρες ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress) αποτελούν το πρώτο στάδιο στην έναρξη της απόκρισης. Ακολούθως η αποκωδικοποίηση αυτών των ερεθισμάτων από τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης GCN2 (General Control Nonderepressible), PERK (PKR like ER Kinase), PKR (Double stranded RNA-dependent Protein Kinase) και HRI (Heme Regulated kinase Inhibitor) αποτελεί το ρυθμιστικό στάδιο στη διαδικασία. Ακολουθεί το επόμενο στάδιο

που είναι και το κομβικό σημείο στο πλαίσιο αυτής της σηματοδότησης και αφορά τη φωσφορυλίωση του eIF2α γεγονός που σημαίνει την μετάβαση στο επόμενο βήμα που είναι το αποτέλεσμα-επίδραση αυτής της φωσφορυλίωσης στη καθολική παύση της μετάφρασης και στο σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες αλλά και στην επιλεκτική μετάφραση μεταγράφων όπως αυτό του ATF4. Τέλος, το εκτελεστικό βήμα στο πλαίσιο της όλης διαδικασίας αφορά στη μεταφορά του ATF4 στον πυρήνα και τη δράση του ως μεταγραφικό παράγοντα για τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων που θα βοηθήσουν στη προσαρμογή στο στρες ή στον κυτταρικό θάνατο, καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν για φωσφατάσες (GADD34, CReP) οι οποίες θα αποφωσφορυλιώσουν τον eIF2α με σκοπό το κλείσιμο του σηματοδοτικού κυκλώματος και κατ'επέκταση την ανάκαμψη από το στρες (63).

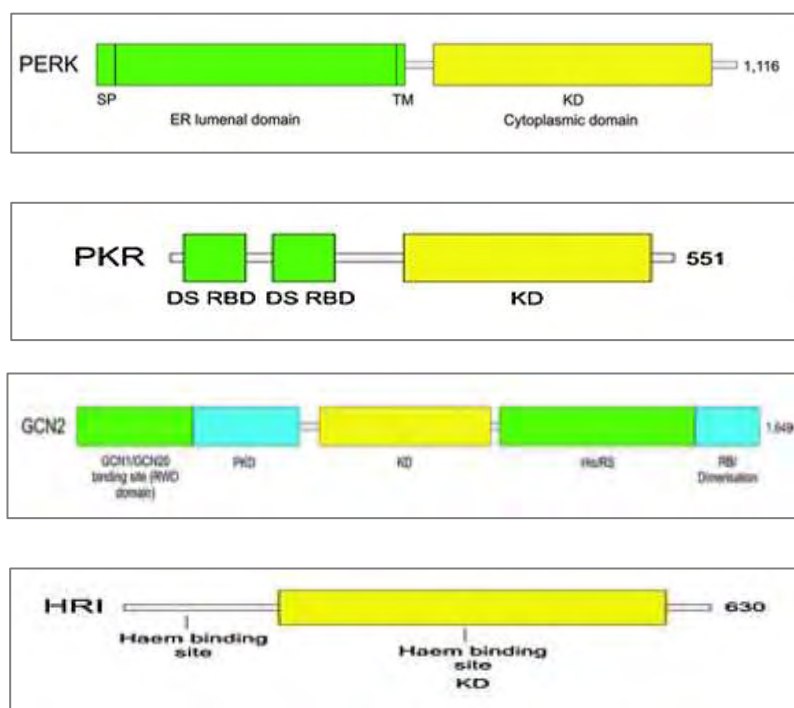


Εικόνα 8: Σταδιοποίηση του σηματοδοτικού συστήματος ISR (63).

1.2.1.2 Δομή των κινασών του eIF2α και ενεργοποίηση τους από στρεσογόνα ερεθίσματα

Οι κινάσες του eIF2α στο πλαίσιο του ISR δρουν ως πρώιμοι ανταποκριτές σε διαταραχές της κυτταρικής ομοιοστασίας. Όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν τέσσερις κινάσες σερίνης/θρεονίνης οι οποίες μοιράζονται εκτεταμένη ομολογία στις καταλυτικές τους επικράτειες, αλλά διαθέτουν ξεχωριστές ρυθμιστικές επικράτειες. Κάθε κινάση του eIF2α διμερίζεται και αυτοφωσφορυλιώνεται για πλήρη ενεργοποίηση. Ωστόσο καθεμία ξεχωριστά αποκρίνεται σε συγκεκριμένα στρεσογόνα ερεθίσματα γεγονός που αντανάκλα τους μοναδικούς ρυθμιστικούς τους μηχανισμούς (63, 64).

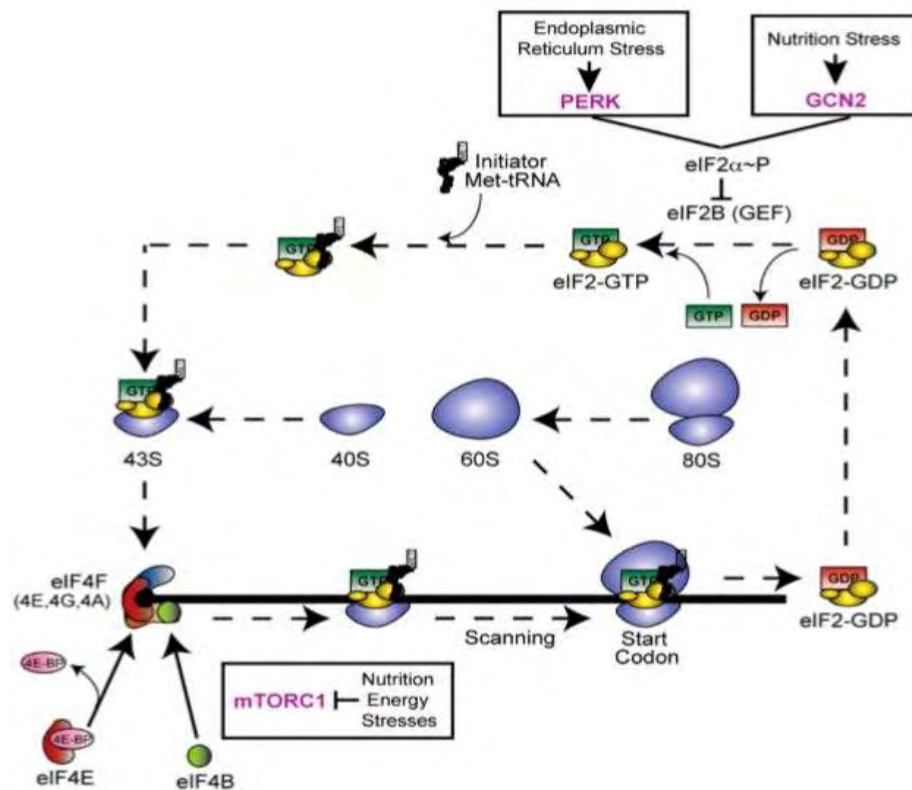
Η κινάση σερίνης/θρεονίνης PERK ενεργοποιείται από τη συσσώρευση μη σωστά πτυχωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Μέσω της φωσφορυλίωσης του eIF2α η PERK μπλοκάρει τη σύνθεση νέων πολυπεπτιδίων και με αυτό τον τρόπο μειώνει την επιπρόσθετη εισαγωγή νέων πολυπεπτιδίων στο ER (63, 64). Η κινάση PKR ανακαλύφθηκε αρχικά ως κινάση που φωσφορυλιώνει τον eIF2α οδηγώντας σε παύση της μετάφρασης των ιϊκών mRNAs και προωθώντας παράλληλα την απόπτωση ως απόκριση σε ιϊκή λοίμωξη (64). Η τρίτη από τις τέσσερις κινάσες του eIF2α ονομάζεται, όπως προαναφέρθηκε, GCN2 και αποτελεί αισθητήρα στέρησης αμινοξέων. Τέλος, η τέταρτη κινάση του eIF2α στο πλαίσιο του συστήματος ολοκληρωμένης απόκρισης στο στρες είναι η HRI. Η κινάση HRI έχει δύο σημαντικούς ρόλους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης: εξασφαλίζει τη σύζευξη της σύνθεσης των σφαιρινών με τη ποσότητα αίμης που υπάρχει στο κύτταρο και προωθεί την επιβίωση των πρόδρομων κυττάρων των ερυθρών αιμοσφαιρίων όταν τα επίπεδα σιδήρου βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα. Ουσιαστικά, τα επίπεδα σφαιρινών-αίμης θα πρέπει να βρίσκονται σε ιδανική στοιχειομετρική αναλογία. Οποιαδήποτε διακύμανση είναι τοξική για το κύτταρο (64). Σημαντικό είναι να τονιστεί πως η κινάση HRI διαμεσολαβεί την απόκριση στο αρσενικό νάτριο (NaAsO_2), έναν χημικό παράγοντα που όταν προστεθεί στο μέσο καλλιέργειας κυττάρων προκαλεί οξειδωτικό στρες και την επαγωγή των κοκκιδίων του στρες (65).



Εικόνα 9: Οργάνωση των δομικών επικρατειών των κινασών του ISR (64).

1.2.1.3 Φωσφορυλίωση του eIF2α και αναστολή της μετάφρασης

Όπως προαναφέρθηκε, η φωσφορυλίωση του eIF2α από τις κινάσες PERK, PKR, GCN2 και HRI οδηγεί σε αναστολή της μετάφρασης. Η αναστολή αυτή σχετίζεται με μία περίπλοκη ρύθμιση στην ευκαρυωτική πρωτεϊνσύνθεση που εστιάζεται κυρίως στο στάδιο της έναρξης που είναι και το ρυθμοκαθοριστικό βήμα όλης της διαδικασίας. Η λεπτή αυτή ρύθμιση παρουσιάζεται σχηματικά στην *Εικόνα 13*:



Εικόνα 10: Μηχανισμός καθολικής παύσης της μετάφρασης μέσω της φωσφορυλίωσης του eIF2α (66).

Η εξαρτώμενη από την 5'-καλύπτρα έναρξη της μετάφρασης μπορεί να διαιρεθεί σε 2 γεγονότα-κλειδιά: την πρόσδεση του ευκαρυωτικού συμπλόκου παραγόντων έναρξης της πρωτεϊνσύνθεσης 4F (eIF4F) στην 5'-καλύπτρα και την επακόλουθη στρατολόγηση του συμπλόκου 43S που αποτελείται από την μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 40S, το εναρκτήριο tRNA που είναι φορτισμένο με το αμινοξύ μεθειονίνη και τον eIF2 που φέρει δεσμευμένο GTP (eIF2-GTP). Κατά την αναγνώριση του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης (AUG) από το πρόδρομο σύμπλοκο έναρξης της πρωτεϊνσύνθεσης 43S, υδρολύεται το GTP που φέρει ο eIF2 σε GDP και το εναρκτήριο μεθειονυλο-tRNA συνδέεται με το AUG στη θέση P της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας. Η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα συνδέεται με τη μικρή και το πλήρες 80S ριβόσωμα ξεκινά την επέκταση και σύνθεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Ακολούθως, ο eIF2-GDP με τη βοήθεια του eIF2B, ενός παράγοντα που υποβοηθά την

ανταλλαγή νουκλεοτιδίων της γουανίνης, ανταλλάσει το GDP με GTP και έτσι ο eIF2-GTP μπορεί να συμπλοκοποιηθεί με το εναρκτήριο μεθειόνυλο-tRNA και τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 40S για να δημιουργήσει το πρόδρομο σύμπλοκο 43S και να ξεκινήσει ένα νέο κύκλο μετάφρασης. Ωστόσο κάτω από καταστάσεις στρες όπως στέρηση αμινοξέων ή στρες ενδοπλασματικού δικτύου έχουμε τη φωσφορυλίωση του eIF2α στη σερίνη 51. Η φωσφορυλίωση αυτή μετατρέπει τον eIF2 σε συναγωνιστικό αναστολέα του eIF2B λόγω της δέσμευσης όλων των μορίων του από τον φωσφορυλιωμένο eIF2α. Αυτό το τελευταίο γεγονός καθιστά τον eIF2B ανενεργό με αποτέλεσμα να είναι αδυνατεί να προωθήσει την ανταλλαγή του GDP με GTP και ως εκ τούτου ο eIF2 παραμένει καθηλωμένος στην GDP μορφή του γεγονός που δεν του επιτρέπει να ξεκινήσει νέο κύκλο μετάφρασης και έτσι η πρωτεϊνοσύνθεση αναστέλλεται στο στάδιο της έναρξης. Η παύση αυτή είναι καθολική και αφορά όλα τα μεταγγραφα του κυττάρου εκτός ορισμένων εξαιρέσεων τα οποία συνεχίζουν να μεταφράζονται (66).

1.2.2 ΚΟΚΚΙΔΙΑ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ

Αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης του eIF2α είναι ο σχηματισμός των κοκκιδίων του στρες. Τα κοκκίδια του στρες είναι μη μεμβρανικές κυτταροπλασματικές εστίες που ποικίλλουν σε μέγεθος από 0,1 σε 2 μm και αποτελούνται από μη-μεταφραζόμενα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια αγγελιοφόρου RNA (mRNA) τα οποία συναθροίζονται στο κυτταρόπλασμα σε κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε αντίξοες για αυτά περιβαλλοντικές συνθήκες. Η δημιουργία τους πυροδοτείται από μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών στρεσογόνων ερεθισμάτων στα οποία συμπεριλαμβάνονται θερμικό σοκ, οξειδωτικό στρες, αυξημένη ωσμωμοριακότητα, λοίμωξη από ιό και έκθεση σε ακτινοβολία που εμπίπτει στο υπεριώδες φάσμα (ακτινοβολία UV). Ωστόσο ακτινοβολία X και γενοτοξικοί παράγοντες δεν επάγουν το σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες. Τα κοκκίδια του στρες εντοπίζονται τόσο σε καλλιεργούμενες κυτταρικές σειρές όσο και σε άθικτους ιστούς (67).

Ο σχηματισμός των κοκκιδίων του στρες έχει παρατηρηθεί στις ζύμες (όπως *Saccharomyces pombe*), στα πρωτόζωα (*Trypanosoma brucei*) και στα μετάρζωα (όπως *Homo sapiens* και *Caenorhabditis elegans*). Έχουν επίσης παρατηρηθεί στα φυτά και στους χλωροπλάστες, δημιουργώντας την υπόθεση ότι η δημιουργία τους ίσως να συμβαίνει και σε προκαρυώτες (67).

Η συνάθροιση και η αποδιοργάνωση των κοκκιδίων του στρες ρυθμίζεται από την επαγόμενη από το στρες φωσφορυλίωση του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF2α γεγονός που οδηγεί σε παύση της πρωτεϊνοσύνθεσης στο στάδιο της έναρξης και την αποσύνθεση των πολυσωμάτων καθώς τα ριβοσώματα που μεταφράζουν ένα mRNA απομακρύνονται από αυτό

μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αντίστοιχου πολυπεπτιδίου. Άρα, η σύσταση των κοκκιδίων του στρες είναι: ριβοσωμικές υπομονάδες 40S, mRNA, πρωτεΐνες δέσμησης στο RNA (RNA binding proteins) και παράγοντες έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης (eIF4E, eIF3, eIF4A, eIF4G). Επιπρόσθετα, είναι γνωστό πως οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες των κοκκιδίων του στρες είναι σε δυναμική ισορροπία με τα πολυσώματα (67).

1.2.2.1 Πρωτεΐνες δέσμησης RNA ως συστατικά των κοκκιδίων του στρες.

Η ταυτοποίηση πρωτεϊνικών συστατικών των κοκκιδίων του στρες στα θηλαστικά ξεκίνησε από την ανακάλυψη δύο σημαντικών πρωτεϊνών δέσμησης στο RNA (RNA Binding Proteins: RBPs): τις TIA-1 και TIAR. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες αποτελούν σημαντικούς δείκτες των κοκκιδίων του στρες. Ο εντοπισμός των TIA-1 (T-cell Internal Antigen 1) και TIAR είναι κυρίως πυρηνικός στα περισσότερα κύτταρα. Ωστόσο, ως απόκριση σε κάποιου είδους περιβαλλοντικού στρες η TIA-1 και η TIAR συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα, όπου συσσωματώνονται με γρήγορους ρυθμούς και επιτυγχάνουν το σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες. Η TIA-1 και η TIAR διαθέτουν τρία αμινοξικά μοτίβα αναγνώρισης RNA στα αμινοτελικά τους άκρα και μία επικράτεια πλούσια σε αμινοξέα γλουταμίνης στα καρβοξυτελικά τους άκρα που είναι απαραίτητη για τη συσσωμάτωσή τους στα κοκκίδια του στρες. Μεταλλάγματα της TIA που στερούνται των περιοχών αναγνώρισης RNA δεν μπορούν να υποβοηθήσουν το σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες. Η ανακάλυψη των δύο προαναφερθέντων πρωτεϊνών-δεικτών των κοκκιδίων του στρες επέτρεψε την ταυτοποίηση και άλλων συστατικών των κοκκιδίων αυτών. Συγκεκριμένα, συστατικά της μικρής αλλά όχι της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας έδειξαν να συνεντοπίζονται με την TIA-1 και την TIAR στα κοκκίδια του στρες. Η απουσία της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας εξάλειψε την πιθανότητα ότι τα κοκκίδια του στρες είναι εστίες στις οποίες επιλεγμένα mRNA μεταφράζονται κατά τη διάρκεια ενός στρες. Τελικώς, επιβεβαιώθηκε πως οι πρωτεΐνες TIA-1 και TIAR δρουν καθοδικά της επαγόμενης από στρες φωσφορυλίωσης του eIF2α με σκοπό τη συνοδεία των mRNAs από τα πολυσώματα στα κοκκίδια του στρες (68).

Μία άλλη σημαντική πρωτεΐνη δείκτης των κοκκιδίων του στρες είναι η G3BP1 (GTPase activating protein SH3 domain Binding Protein 1) η οποία αποτελεί και πρωτεΐνη η οποία σχηματίζει συσσωματώματα και ρυθμίζει τη συναρμολόγηση των κοκκιδίων του στρες. Η G3BP1 διαθέτει έναν πολύ σημαντικό «μοριακό παρτενέρ» την πρωτεΐνη USP10 (Ubiquitin Specific processing Protease 10). Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες μετακινούνται μαζί με τα μη μεταφραζόμενα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα λόγω παύσης της μετάφρασης στα κοκκίδια του στρες. Σε κύτταρα θηλαστικών αποσιώπησε είτε της G3BP1 είτε της USP10 παρεμποδίζει τη συναρμολόγηση των κοκκιδίων του στρες, υποδεικνύοντας ότι η απο-ουβικουϊτίνωση

κάποιου συστατικό των mRNPs ρυθμίζει τη συναρμολόγηση των mRNPs. Η G3BP1 αλληλεπιδρά και με άλλες πρωτεΐνες όπως η Caprin1 (69) και HDAC6 που επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη συναρμολόγηση των κοκκιδίων του στρες (70).

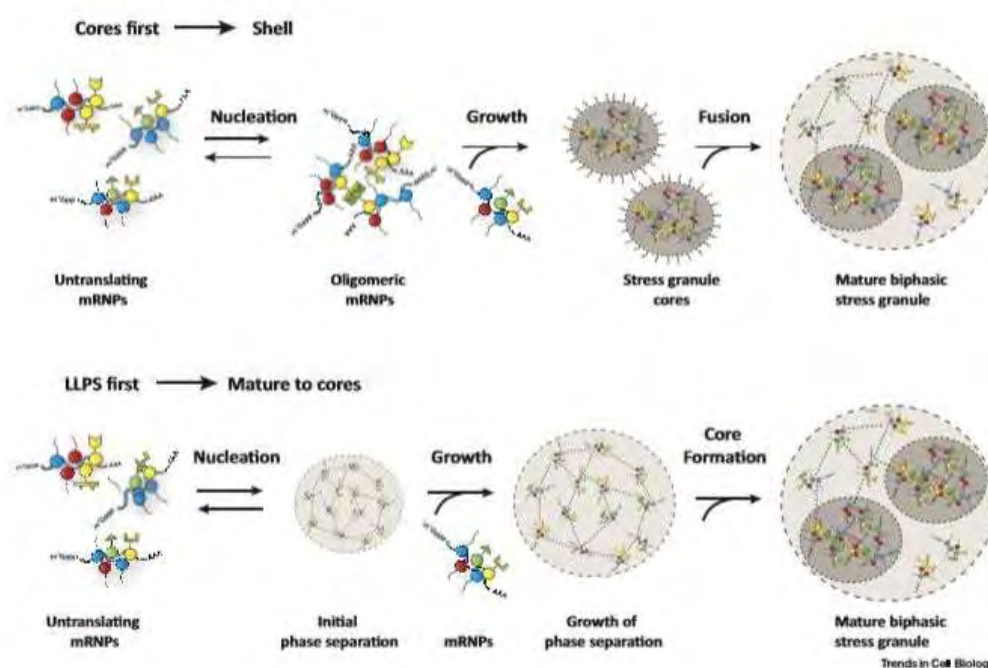
1.2.2.2 Ενδογενώς αδόμητες περιοχές: ρόλος στη δυναμική και στη συναρμολόγηση των κοκκιδίων του στρες

Οι πρωτεΐνες δέσμευσης στο RNA που αποτελούν ένα από τα βασικά συστατικά των κοκκιδίων του στρες διαθέτουν επικράτειες με τις οποίες αλληλεπιδρούν με το RNA, αλλά διαθέτουν και επικράτειες μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι περιοχές αυτές συγκαταλέγονται στις ενδογενώς αδόμητες περιοχές (ID domains: Intrinsically Disordered Domains) οι οποίες μπορούν να υιοθετούν πολλαπλές διαμορφώσεις οι οποίες επιτρέπουν παροδικές άλλα εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις οι οποίες είναι πιο σταθερές κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης. Σε αυτή την κατηγορία των ID επικρατειών συγκαταλέγονται οι περιοχές χαμηλής πολυπλοκότητας που επιτρέπουν την αυτό-συσσώματωση των πρωτεϊνών που τις φέρουν και περιοχές που προσομοιάζουν αυτών των πρωτεονίων (prions, prion-like domains) (71).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως ασθενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των IDPRs μπορούν να ρυθμίζουν μια διαδικασία διαχωρισμού φάσης (phase separation) που συγκεντρώνει αυτές τις πρωτεΐνες σε διακριτές υποκυτταρικές περιοχές. Οι IDPRs ή ID περιοχές είναι αρκετά δυναμικές και μπορούν γρήγορα να μετακινούνται από συμπαγείς σε εκτεταμένες διαμορφώσεις. Ο επαγόμενος από τις IDPR περιοχές διαχωρισμός υγρής φάσης οδηγεί στη δημιουργία σφαιρικών σταγονιδίων, μία μορφολογία που ελαχιστοποιεί τη διεπιφάνεια μεταξύ σταγονιδίων και του παράπλευρου κυτταροπλάσματος. Αυτές οι σταγόνες συντήκονται μεταξύ τους και σε διάστημα ολίγων δευτερολέπτων αναδιοργανώνουν το περιεχόμενό τους. Περιοχές IDPR συναντώνται σε πολλές RBPs των κοκκιδίων του στρες όπως η TIA-1/R και η G3BP και παίζουν σημαντικούς ρόλους στη συμπύκνωση των κοκκιδίων του στρες. Η παρατήρηση ότι οι πρωτεΐνες των κοκκιδίων του στρες μπορούν να προωθήσουν το σχηματισμό σταγονιδίων τα οποία μεταβαίνουν σε αδιάλυτα συσσωματώματα, υποδεικνύει τη συσχέτισή τους με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) και η νόσος Alzheimer (72).

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι τα κοκκίδια του στρες αποτελούνται από σταθερούς πυρήνες που περιβάλλονται από ένα δυναμικό κέλυφος (72). Έχουν προταθεί δύο σημαντικά μοντέλα. Στο ένα από τα δύο μοντέλα στην πρώτη φάση συναρμολόγησης επιτυγχάνεται η εμπυρήνωση από τη συσσωμάτωση μη μεταφραζόμενων mRNPs σε ολιγομερή. Στη δεύτερη

φάση λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη των ολιγομερών σε μεγαλύτερα συναθροίσματα μέσω προσθήκης και άλλων μη μεταφραζόμενων mRNPs με αποτέλεσμα το σχηματισμό «πυρήνων». Στην τρίτη φάση συναρμολόγησης έχουμε τη σύντηξη των «πυρήνων» και στρατολόγηση του δυναμικού κελύφους για το σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες που παρατηρούνται μέσω μικροσκοπίας (73).



Εικόνα 11: Δύο μοντέλα με διακριτές φάσεις κατά τη διάρκεια συναρμολόγησης των κοκκιδίων του στρες (73).

Στο δεύτερο μοντέλο, αρχικά διεκπεριώνεται η εμπυρήνωση μη μεταφραζόμενων mRNPs σε αρχικά σταγονίδια διαχωρισμού φάσης όπου τα mRNPs συγκρατούνται μεταξύ τους με ασθενείς αλληλεπιδράσεις. Ακολούθως, γίνεται η μεγέθυνση-ανάπτυξη των αρχικών σταγονιδίων μέσω προσθήκης ριβονουκλεοπρωτεϊνών. Τέλος, επιτυγχάνεται η συναρμολόγηση του κοκκιδίου του στρες μέσω σχηματισμού πυρήνων μέσα στο σταγονίδιο διαχωρισμού φάσης λόγω της υψηλής τοπικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών εντός των σταγονιδίων (73).

Οι μηχανισμοί αποσυναρμολόγησης των κοκκιδίων του στρες περιλαμβάνουν την έξοδο-απελευθέρωση των mRNPs από την αναστολή της μετάφρασης, την αποικοδόμηση των mRNAs που δρουν ως ικριώματα στη συναρμολόγηση των κοκκιδίων του στρες, την αποικοδόμηση μέσω πρωτεασώματος συστατικών των κοκκιδίων του στρες, την διαμεσολαβούμενη από πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς αποδιοργάνωση συστατικών των κοκκιδίων του στρες και τέλος τη μερική ή ολοκληρωτική εγκόλπωση μέσω αυτοφαγοσωμάτων και επακόλουθη αποικοδόμηση μέσω αυτοφαγίας συστατικών των κοκκιδίων του στρες (74).

1.2.2.3 Οι γενικές λειτουργίες των κοκκιδίων του στρες

Οι λειτουργίες που επιτελούν τα κοκκίδια του στρες είναι σημαντικές για τη γενικότερη κυτταρική ομοιοστασία. Συγκεκριμένα, τα κοκκίδια του στρες σχηματίζονται για να προωθήσουν τη συναρμολόγηση συμπλόκων έναρξης της μετάφρασης αυξάνοντας την τοπική συγκέντρωση των mRNAs και των παραγόντων έναρξης της μετάφρασης. Ωστόσο, η μετάφραση αυτή καθεαυτή δεν δύναται να πραγματοποιηθεί στα κοκκίδια του στρες, δεδομένης της απουσίας των ριβοσωμικών υπομονάδων 60S. Επίσης, μια ενδιαφέρουσα θεωρία υποστηρίζει πως ο σχηματισμός των κοκκιδίων του στρες απαιτείται για να επιτρέψει, παρόλη την καθολική παύση της πρωτεϊνοσύνθεσης, τη μετάφραση mRNAs που θα οδηγήσουν σε απόκριση στο στρες. Παράλληλα, τα κοκκίδια του στρες λειτουργούν ως αποθήκες mRNAs των οποίων η μετάφραση αναστέλλεται, αλλά απελευθερώνονται ξανά για μετάφραση μόλις το στρεσογόνο ερέθισμα υποχωρήσει (75).

Επιπρόσθετα λειτουργούν ως σηματοδοτικοί κόμβοι (hubs), δηλαδή σημεία συνάθροισης διαφόρων σηματοδοτικών πρωτεϊνών και με αυτό τον τρόπο μπορούν να ενσωματώνουν ποικίλους σηματοδοτικούς καταρράκτες με σκοπό την ενορχηστρωμένη κυτταρική απόκριση στο στρες. Μία μεγάλη ποικιλία σηματοδοτικών πρωτεϊνών συσσωρεύεται στα κοκκίδια του στρες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνες προσαρμογής/ικριώματος (adaptor/scaffold proteins), κινάσες λιπιδίων και πρωτεϊνών, φωσφατάσες, ριβονουκλεάσες, ελικάσες, ριβοζυλο-τρανσφεράσες, γλυκοζυλοτρανσφεράσες, GTPασες, μεθυλοτρανσφεράσες και ένζυμα τροποποίησης με βάση την ουβικιτίνη. Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες (π.χ DDX3/Ded1, roquin) συνεισφέρουν στη συναρμολόγηση των κοκκιδίων του στρες και η μειωμένη τους έκφραση συσχετίζεται με αναστολή της συγκρότησης των κοκκιδίων του στρες. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως εμμέσως μπορούν να επηρεάσουν διάφορες σηματοδοτικές οδούς των οποίων τα συστατικά στοιχεία συμμετέχουν στο σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες. Η στρατολόγηση πρωτεϊνών ικριώματος (TRAF2 και RACK1) στα κοκκίδια του στρες αναστέλλει τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία αυτές οι πρωτεΐνες συμμετέχουν χωρίς να επηρεάζουν το σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες (71).

Μερικά σημαντικά παραδείγματα πρωτεϊνών με σηματοδοτικές λειτουργίες που σχετίζονται με τα κοκκίδια του στρες είναι η σηματοδότηση μέσω RACK1/p38/JNK. Συγκεκριμένα, η RACK1 είναι μία πλειοτροπικής δράσης πρωτεΐνη-προσαρμογέας (adaptor protein). Παρόλο που στερείται ενδογενώς αδόμητων περιοχών, είναι μέρος της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας 40S και προσδένει το σύμπλοκο του eIF3 τα οποία αποτελούν κύρια συστατικά στοιχεία των κοκκιδίων του στρες. Η στρατολόγηση της RACK1 στα κοκκίδια του στρες αναστέλλει την επαγόμενη από το στρες ενεργοποίηση της σηματοδότησης p38/JNK η οποία ευθύνεται για την

έναρξη της απόπτωσης, υποδεικνύοντας προσαρμοστική απόκριση στο στρες. Επίσης, η RACK1 δρα σαν πρωτεΐνη ικρίωματος που οδηγεί στον ολιγομερισμό της MTK1 (Mitogen activated protein Kinase 1) η οποία δρα ανοδικά των p38 και JNK για την πυροδότηση της απόπτωσης. Αυτή η διαδικασία αναστέλλεται όταν η RACK1 συσσωρεύεται στα κοκκίδια του στρες (71).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε κύτταρα θηλαστικών, η συγκρότηση των κοκκιδίων του στρες κυρίως ξεκινά από την επαγόμενη από το στρες φωσφορυλίωση του eIF2α στη σερίνη 51 στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης απόκρισης στο στρες (ISR). HOGFOD1 (2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase domain containing) είναι μία πρωτεΐνη που συμμετέχει ενεργά στην εμπυρήνωση των κοκκιδίων του στρες και επίσης αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με πρωτεΐνες των κοκκιδίων του στρες όπως οι G3BP1, USP10, Caprin1, YB-1, η κινάση HRI και ο eIF2α. Τα επίπεδα έκφρασης της εν λόγω πρωτεΐνης συσχετίζονται με φωσφορυλίωση του eIF2α και συγκρότηση των κοκκιδίων του στρες. Ακόμα, διαθέτει ενδογενώς αδόμητες περιοχές όπως και οι πρωτεΐνες με τις οποίες προσδένεται και αλληλεπιδρά (71).

Μία σημαντική κινάση με γενικά ενεργό σηματοδοτικό ρόλο αλλά και στο πλαίσιο μελέτης των κοκκιδίων του στρες είναι η TOR (Target of Rapamycin). Η κινάση TOR διαθέτει δύο διακριτά σύμπλοκα τα οποία ονομάζονται TORC1 και TORC2 που ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον μεταβολισμό. Η συναρμολόγηση των κοκκιδίων του στρες σε απόκριση στο στρες τόσο στις ζύμες όσο και σε ανθρώπινα κύτταρα αλλάζει την σηματοδότηση μέσω TORC1 μέσω συσσώρευσης τόσο του συμπλόκου TORC1 όσο και καθοδικότερων κινασών σε αυτά. Κάτω από βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, σήματα από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και από περιβαλλοντικά θρεπτικά συστατικά δρουν για να κρατήσουν το σύμπλοκο TORC1 ενεργό επιτρέποντας την προώθηση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Στέρηση αμινοξέων απενεργοποιεί το σύμπλοκο TORC1, και το απενεργοποιημένο σύμπλοκο συσσωρεύεται στα κοκκίδια του στρες. Κατά την ανάκαμψη από το στρες η επανενεργοποίηση του TORC1 συσχετίζεται με την απελευθέρωση από τα αποσυναρμολογούμενα κοκκίδια του στρες, οδηγώντας στην υπόθεση πως η συσσώρευση του συμπλόκου στα κοκκίδια τους στρες ρυθμίζει τη συγχρονισμένη απενεργοποίηση και επανενεργοποίηση του TORC1 σε στρεσαρισμένα κύτταρα (76).

Ένα τελευταίο παράδειγμα που υποδηλώνει ότι τα κοκκίδια του στρες αποτελούν θέσεις συσσώρευσης σηματοδοτικών πρωτεϊνών και ως εκ τούτου είναι ικανά να επαναπρογραμματίζουν με αυτό τον τρόπο μείζονες σηματοδοτικές οδούς με σκοπό την απόκριση στο στρες και την προσαρμογή του εκάστοτε κυττάρου, είναι η κινάση ROCK1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1). Όπως η συσσώρευση της RACK1 στα κοκκίδια του στρες παρεμποδίζει την επαγόμενη από την JNK απόπτωση (77), έτσι και η

συσσώρευση ενεργής ROCK1 στα κοκκίδια του στρες παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση μίας πρωτεΐνης ονόματι JIP-1 (JNK-interacting protein-1) που αποτελεί υπόστρωμα της ROCK1 και είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της JNK και την επαγωγή της απόπτωσης. Άρα το αποτέλεσμα είναι η αναστολή της απόπτωσης και η διατήρηση της κυτταρικής επιβίωσης (71).

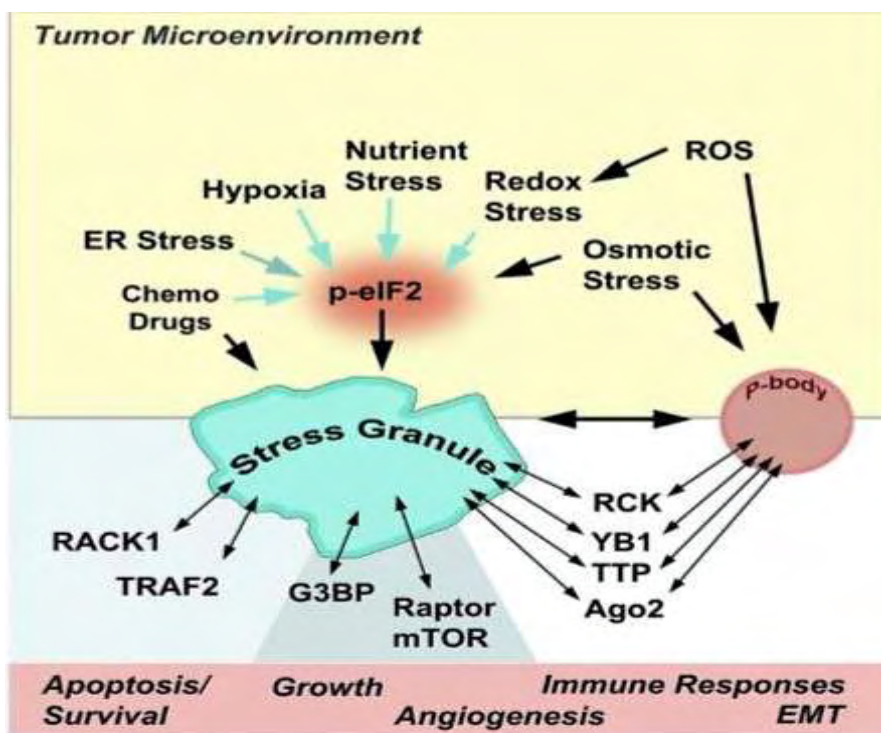
1.2.2.4 Αρσενικό, κοκκίδια του στρες, καρκίνος και υποξία

Η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) δεν θεωρείται οξειδωτικό στρες όταν η απομάκρυνσή τους είναι εφικτή μέσω του αντι-οξειδωτικού μηχανισμού του κυττάρου. Ωστόσο, όταν η χρόνια παραγωγή ROS υπερβαίνει την αντι-οξειδωτική άμυνα του κυττάρου, τότε προκαλείται οξειδωτικό στρες λόγω της εξάντλησης των αναγωγικών ισοδυνάμων όπως ανηγμένο NADH/NADPH και γλουταθειόνη. Οι κύριοι αισθητήρες της οξειδοαναγωγικής ανισορροπίας είναι κατάλοιπα κυστεΐνης σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως οι KEAP/NRF2 και HSF1 (78). Οι ενώσεις αρσενικού προσδένονται άμεσα σε ανηγμένες κυστεΐνες σε πρωτεΐνες και απενεργοποιούν περίπου 200 ένζυμα, συμπεριλαμβανομένου σημαντικών αντι-οξειδωτικών ενζύμων (αναγωγάση της γλουταθειόνης, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, αναγωγάση της θειορεδοξίνης και υπεροξειδάση), σηματοδοτικών κινασών και φωσφατασών, ενζύμων-κλειδιά στο μεταβολισμό και σηματοδοτικών ενζύμων. Ουσιαστικά η αυξημένη παραγωγή ROS στην περίπτωση του αρσενικού οφείλεται στην ικανότητα του αρσενικού να απενεργοποιεί προστατευτικά αντι-οξειδωτικά συστήματα που φυσιολογικά θα αντιστάθμιζαν την ανισορροπία που προκαλείται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Το αρσενικόδες νάτριο ήταν το πρώτο χημικό που βρέθηκε να οδηγεί στο σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες και αποτελεί το πιο αποτελεσματικό αντιδραστήριο για την επαγωγή της συναρμολόγησης των εν λόγω κοκκιδίων. Η επαγωγή των κοκκιδίων του στρες από το αρσενικόδες νάτριο σχετίζεται με προαγωγή αντίστασης στην απόπτωση. Οι διαμεσολαβούμενες από τα κοκκίδια του στρες βραχυπρόθεσμες αποκρίσεις περιλαμβάνουν στρατολόγηση/απενεργοποίηση προ-αποπτωτικών παραγόντων (RACK1, TRAF2) στα κοκκίδια του στρες ή συσσώρευση mRNAs που κωδικοποιούν για προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες με παρόμοιο τρόπο. Το αρσενικόδες νάτριο δρα στη φωσφορυλίωση του eIF2α μέσω ενεργοποίησης της κινάσης HRI (78). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ισορροπία G3BP1-USP10 συντονισμένα ρυθμίζει τα επίπεδα των ROS και αναστέλλει την απόπτωση όταν και οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στα κοκκίδια του στρες κατόπιν έκθεσης σε αρσενικόδες νάτριο (79).

Η διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ των κοκκιδίων RNA και της αποπτωτικής μηχανής ρυθμίζει τη λεπτή ισορροπία μεταξύ κυτταρικής επιβίωσης ή κυτταρικού θανάτου. Οι πρόσφατες αποδείξεις υποδεικνύουν ότι τα κοκκίδια RNA μπορούν να δράσουν ως σημαντικά σηματοδοτικά/ρυθμιστικά κέντρα που χρησιμοποιούνται από τα καρκινικά κύτταρα ώστε να

εξασφαλίσουν την επιβίωσή τους σε εχθρικά νεοπλασματικά μικροπεριβάλλοντα, όπως επίσης και στην απόκριση στη χημειοθεραπεία ή στη ραδιοθεραπεία (78). Πράγματι, η λειτουργία των κοκκιδίων του στρες σχετίζεται με την ικανότητα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Οι πρωτεΐνες YB-1 και LIN28 είναι πολυλειτουργικές RBPs που ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών CSD (Cold Shock Domain proteins). Και οι δύο μεταφέρονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και αντίστροφα και εμφανίζονται τόσο στα κοκκίδια του στρες όσο και στα P-bodies. Έχει δειχθεί η υπερέκφραση αυτών των πρωτεϊνών σε μια ευρεία ποικιλία συμπαγών όγκων και αιματολογικών κακοηθειών. Στον καρκίνο η διαμεσολαβούμενη από την LIN-28 μείωση της έκφρασης των let-7 μικρών RNA που έχουν ογκοκατασταλτική δράση οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των στόχων mRNAs των let-7 μικρών RNA που κωδικοποιούν για παράγοντες που προωθούν τον πολλαπλασιασμό, την ογκογένεση και την αναστολή της απόπτωσης (78).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός συμπαγούς όγκου συντελείται γρήγορος και ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων. Αυτό το γεγονός οδηγεί σε ανικανότητα του υπάρχοντος κυκλοφορικού συστήματος να παράσχει την απαραίτητη ποσότητα θρεπτικών και οξυγόνου μέσω των αγγειακών δικτύων, καθώς ο ρυθμός κατανάλωσης από τον όγκο είναι πολύ μεγαλύτερος από τον ρυθμό παροχής από τα αγγεία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υποξικών περιοχών. Ωστόσο αν και οι όγκοι αντισταθμίζουν αυτή την έλλειψη μέσω της επαγωγής σχηματισμού νέων αγγείων (νεοαγγειογένεση), συνήθως τα νέα αιμοφόρα αγγεία δεν έχουν την τυπική δομή και μορφολογία. Ο υψηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού και η δυσλειτουργία της πρωτεϊνοσύνθεσης οδηγεί σε στρες ενδοπλασματικού δικτύου, αποτέλεσμα της μη σωστής πτύχωσης πρωτεϊνών και υπερφόρτωσης του ενδοπλασματικού δικτύου λόγω ανισορροπίας στην πρωτεϊνοσύνθεση και σε ακατάλληλη αναδίπλωση πρωτεϊνών. Όλες αυτές οι καταστάσεις δημιουργούν ένα εχθρικό μικροπεριβάλλον που επηρεάζει διάφορες πλευρές της ανάπτυξης ενός όγκου και του μεταβολισμού (78).



Εικόνα 12: Κοκκίδια RNA και νεοπλασματικό μικροπεριβάλλον (78).

Τα καρκινικά κύτταρα προσαρμόζονται στο υποξικό μικροπεριβάλλον μέσω ελάττωσης της διαδικασίας της αερόβιας παραγωγής ATP μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και αύξησης της διαδικασίας της αναερόβιας γλυκόλυσης. Η στροφή στον αναερόβιο μεταβολισμό στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων αποτρέπει τη διαρροή ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα λόγω της ατελούς αναγωγής του μοριακού οξυγόνου, το οποίο εκλείπει λόγω της υποξίας, και έτσι μειώνει την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS). Εκτός όμως από τη μεταβολική προσαρμογή στην υποξία, που οφείλεται κατά κύριο λόγο στη δράση των HIF, τα καρκινικά κύτταρα εκμεταλλεύονται και τον σχηματισμό των κοκκιδίων τους στρες για να αποφύγουν την απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο κάτω από τις στρεσογόνες συνθήκες που δημιουργεί το εχθρικό μικροπεριβάλλον, ιδιαίτερα κατά τη χορήγηση ακτίνο- ή χημειοθεραπείας. Όμως η συσχέτιση ή επικοινωνία μεταξύ κοκκιδίων του στρες και κυτταρικής απόκρισης στην υποξία (η οποία χαρακτηρίζει τους περισσότερους συμπαγείς όγκους) δεν έχει σαφώς διαλευκανθεί. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι η ανοξία (<0,1% O₂) ή η έντονη υποξία (0,1% O₂) πυροδοτούν το σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες σε διάφορες κυτταρικές σειρές (80). Ωστόσο τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της ήπιας και πιο φυσιολογικής υποξίας (1 % O₂) στο σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες παρουσιάζουν αντιφάσεις που ίσως σχετίζεται με το είδος του εκάστοτε κυτταρικού τύπου (77, 80, 81).

Παρόλο που δεν υπάρχει μία σαφή σύνδεση μεταξύ υποξίας και σχηματισμού των κοκκιδίων του στρες, υπάρχουν ενδείξεις ότι δύο σημαντικές πρωτεΐνες, οι YB-1 και αγγειογενίνη μπορεί

να αποτελούν συνδετικούς κρίκους. Η αγγειογενίνη είναι υπεύθυνη για την τμήση των tRNAs εντός του βρόχου των αντικωδικονίων τους, μια διαδικασία που οδηγεί στη δημιουργία δύο μικρών RNA που ονομάζονται tiRNAs από κάθε μισό του ώριμου tRNA. Για αυτό το λόγο η αγγειογενίνη οδηγεί σε παύση της μετάφρασης και επαγωγή του σχηματισμού των κοκκιδίων του στρες (82). Επειδή η παραγωγή της αγγειογενίνης μπορεί να επαχθεί από την υποξία (83), η αγγειογενίνη ίσως είναι μέρος ενός συνδέσμου μεταξύ της απόκρισης στην υποξία και της απόκρισης σε είδη στρες που επάγουν τη συναρμολόγηση των κοκκιδίων του στρες. Η YB-1 (Y-box binding protein 1), είναι μία διατηρημένη πρωτεΐνη που προσδένει τόσο DNA όσο και RNA και επηρεάζει τη μεταγραφή καθώς επίσης την επεξεργασία και μετάφραση του RNA, συναθροίζεται στα κοκκίδια του στρες και διαθέτει ογκογόνο δυναμικό μέσω προώθησης κακοήθους μετασχηματισμού, διείσδυσης και ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπευτικά μέσα (84). Η YB-1 επάγει και τον σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες (85-87) και την έκφραση του HIF-1α (88).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η εργασία αυτή αποτελείται από δύο μέρη. Γενικός σκοπός του πρώτου μέρους ήταν η μελέτη της επίδρασης της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία και του HIF-1 στους μηχανισμούς μιτοχονδριακής απόπτωσης. Από τη βιβλιογραφία (60) ήταν γνωστό πως σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) και αναστολής των ERK (αδυναμία φωσφορυλίωσης στις σερίνες 641 και 643 στην περιοχή ETD, αμινοξέα 616-658 του HIF-1α), ο HIF-1α μετατοπίζεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου μέσω αλληλεπίδρασης της μορταλίνης με την επικράτεια ETD, οδηγείται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου δρα ως αναστολέας της απόπτωσης. Η αναστολή αυτή απαιτεί τις αμινοξικές αλληλουχίες εκατέρωθεν της ETD, όπου είναι πιθανόν να υπάρχουν θέσεις αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες που υποβοηθούν τον αντι-αποπτωτικό ρόλο του HIF-1α. Η ταυτοποίηση αυτών των πρωτεϊνών αποτέλεσε τον ειδικό σκοπό του πρώτου μέρους. Στο πλαίσιο αυτό, πειραματικοί στόχοι αποτέλεσαν α) η κλωνοποίηση του cDNA που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία 348-616 του HIF-1α σε πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1, β) η υπερέκφραση σε βακτήρια και απομόνωση τόσο του πολυπεπτιδίου που περιέχει αμινοξική αλληλουχία 348-616 του HIF-1α όσο και των πολυπεπτιδίων των αμινοξικών τμημάτων 530-826 και 652-826 του HIF-1α, τα cDNA των οποίων ήταν ήδη κλωνοποιημένα, και γ) η χρησιμοποίηση των πολυπεπτιδίων αυτών ως «δολώματα» σε πειράματα συγκατακρήμνισης με πρωτεΐνες από εκχύλισμα κυττάρων Huh7 για την ταυτοποίηση πιθανών αλληλεπιδράσεων.

Γενικός σκοπός του δεύτερου μέρους ήταν η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία και του HIF-1 με τους μηχανισμούς σχηματισμού των κοκκιδίων του στρες, τα οποία αποτελούν έναν βασικό αντι-αποπτωτικό μέσο. Στο πλαίσιο αυτό, πειραματικοί στόχοι αποτέλεσαν α) η μικροσκοπική παρατήρηση και ποσοτικοποίηση του σχηματισμού των κοκκιδίων του στρες που προκαλεί η προσθήκη NaAsO₂ σε κύτταρα Huh7 και MCF7 που είχαν προεπωασθεί σε συνθήκες νορμοξίας (21% O₂) ή υποξίας (1% O₂) και β) ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α μετά από επίδραση του NaAsO₂ στις ίδιες κυτταρικές σειρές κατά την υποξία.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα μικροβιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνουν βακτήρια E.Coli TOP10 και BL21-RIL τα οποία διαθέτουν ανθεκτικότητες σε στρεπτομυκίνη και χλωραμφαινικόλη, αντίστοιχα. Το βακτηριακό στέλεχος E.ColiTOP10 ενδείκνυται για μετασχηματισμό με εξωγενές DNA, ενώ τα BL21-RIL φέρουν γονίδια για την παραγωγή tRNA που αναγνωρίζουν όλα τα κωδικόνια για αργινίνη, ισολευκίνη και λευκίνη και είναι κατάλληλα για την υπερέκφραση ετερόλογων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

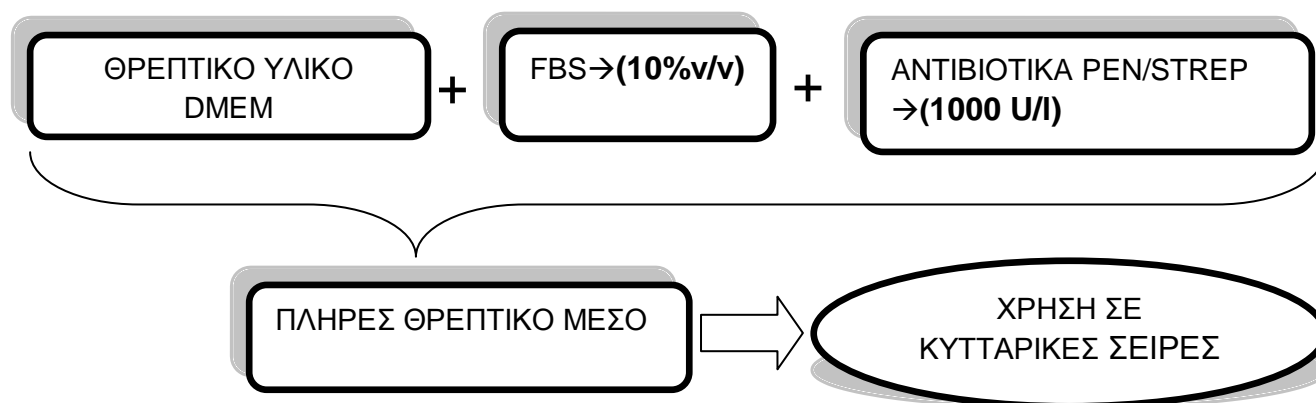
3.1.2 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές Huh7 (ηπατοκαρκίνωμα) και MCF7 (καρκίνος του μαστού).

3.1.3 Μέσα κυτταροκαλλιέργειας

Από τις εταιρείες BIOSERA και Applichem χρησιμοποιήθηκαν:

- **Θρεπτικό υλικό DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose*).** Διαθέτει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, πυροσταφυλικό νάτριο και L-γλουταμίνη. Ενδείκνυται για την καλλιέργεια των περισσότερων καρκινικών κυτταρικών σειρών.



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της τελικής σύστασης του πλήρους θρεπτικού μέσου καλλιέργειας κυττάρων Huh7 και MCF7

- **Βόειος εμβρυϊκός ορός (10% v/v FBS).** Παρέχει στα καλλιεργούμενα κύτταρα τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες που απαιτούνται για την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό τους. Πριν από τη χρήση του, ο ορός υφίσταται μια σύντομη διαδικασία θερμικής απενεργοποίησης σε υδατόλουτρο (heatblock), όπου θερμαίνεται

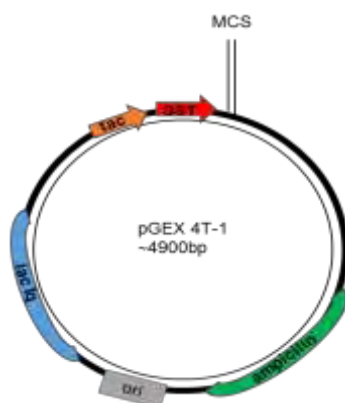
στους 56°C για 30 λεπτά. Ακολούθως διαχωρίζεται σε μικρότερες ποσότητες (aliquots) και διατηρείται στους -20 °C.

- **Αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (1000U/l).** Το αντιβιοτικό σχήμα (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) συνεισφέρει αποτελεσματικά στην προστασία των κυτταρικών σειρών από επιμόλυνση εξωγενών μικροβιακών παραγόντων. Η πενικιλίνη παρεμβαίνει στο τελικό στάδιο σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, ενώ η στρεπτομυκίνη συνδέεται με την 30S ριβοσωμική υπομονάδα οδηγώντας σε λανθασμένη ανάγνωση του αναγνωστικού πλαισίου και συνεπώς δυσλειτουργία στην πρωτεϊνοσύνθεση.
- **Διάλυμα τρυψίνης EDTA 1x σε PBS.** Η τρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που διασπά πολυπεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυ-τελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης. Χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των καρκινικών κυττάρων από το στερεό υπόστρωμα του τρυβλίου καλλιέργειας όπου και αναπτύσσονται, αλλά και από την μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Το διάλυμα τρυψίνης διαχωρίζεται σε μικρές ποσότητες (aliquots) σε σωληνάρια τύπου Falcon τα οποία διατηρούνται στους -20 °C.
- **DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο)** (εταιρεία Applichem). Το DMSO είναι μία χημική ένωση που δρα κρυοπροστατευτικά, αλλάζοντας τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης εμποδίζοντας το σχηματισμό παγοκρυστάλλων οι οποίοι κατά τη διαδικασία της ψύξης κυττάρων (είτε στους -80 °C, είτε σε υγρό N₂) ευθύνονται για την καταστροφή τους. Επομένως η προσθήκη του DMSO κατά τη ψύξη των κυττάρων συνεισφέρει θετικά στην ελαχιστοποίηση των κυτταρικών απωλειών. Η τελική του συγκέντρωση στο υλικό παγώματος (freezing medium) των κυττάρων είναι 10% v/v (όγκο κατ'όγκον).

3.1.4 Πλασμιδιακοί φορείς

- pGEX-4T-1

Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-4T-1 φέρει τον υβριδικό υποκινητή tac και εκφράζει ανασυνδυασμένη S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) του οργανισμού *Schistosoma japonicum*. Χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πεπτιδίων του HIF-1α (652-826, 530-826 και 348-616) σε σύντηξη με τον επίτοπο GST, σε βακτηριακά στελέχη BL21-RIL.



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pGEX 4T-1

3.1.5 Υλικά χρωματογραφίας

- Σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης (GSH-Sepharose, Macherey-Nagel). Τα σφαιρίδια αυτά φέρουν ανηγμένη γλουταθειόνη που αποτελεί υπόστρωμα για την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των GST χημικών πρωτεϊνών με χρωματογραφία αχιστείας και πειράματα συγκατακρήμνισης (pull down assays).

3.1.6 Εκκινητές

- Το τμήμα cDNA που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία **348-616** του HIF-1α ενισχύθηκε με χρήση των εκκινητών:

HIF1348F: 5' TTTT**TGGATCC**ATGCACGACTTGATTTTCTCCCTTC 3'

HIF1616R: 5' TTTT**TGGATCC**CTGCAGTCAAGTGGTGGCATTAGCAGTAGG3'

Με έντονη γραφή επισημαίνεται η θέση αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο BamHI (**GGATCC**), ενώ με υπογράμμιση επισημαίνεται η θέση του περιοριστικού ενζύμου PstI (CTGCAG). Η πρώτη εξασφαλίζει τη δυνατότητα πέψης του εν λόγω τμήματος του HIF-1α για τη δημιουργία συμπληρωματικών άκρων BamHI με σκοπό την κλωνοποίηση τους σε

πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1 που επίσης έχει υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο, ενώ η δεύτερη εξασφαλίζει σε συνδυασμό με μια σειρά άλλων ίδιων θέσεων αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1 τη δημιουργία προφύλ πέψης πλασμιδιακού DNA για την επιβεβαίωση της κλωνοποίησης του τμήματος με τον σωστό προσανατολισμό.

3.1.7 Αντισώματα

Αντίσωμα	Οργανισμός	Αραίωση	Τύπος	Προέλευση
Anti-HIF1α	Κουνέλι	1:2000, 1:1000	Πολυκλωνικό	(89)
Anti-G3BP1	Ποντίκι	1:1000	Μονοκλωνικό	Santa Cruz Biotechnology
Anti-actin	Ποντίκι	1:5000	Μονοκλωνικό	Cell Signalling Biotechnology
Anti-GST	Κουνέλι	1:5000	Πολυκλωνικό	(57)
Anti-tubulin	Ποντίκι	1:10000	Μονοκλωνικό	Cell Signalling Biotechnology
Anti-GRP75	Κουνέλι	1:1000	Πολυκλωνικό	(89)

Πίνακας 1: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

3.1.8 Ένζυμα

Για εφαρμογές πέψης πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν οι εξής περιοριστικές ενδονουκλεάσες της εταιρείας New England Biolabs:

- BamHI-HF (20.000U/ml)
- PstI-HF (20.000 U/ml)

Για τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) χρησιμοποιήθηκε η θερμοάαντοχη πολυμεράση Vent (2000 U/ml).

Για αντιδράσεις λιγάσης (ligation reactions) χρησιμοποιήθηκε η DNA λιγάση T4 (400.000 U/ml), καθώς και η αλκαλική φωσφατάση CIP (Calf-intestinal alkaline phosphatase, 10.000 U/ml).

3.1.9 Χημικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών:

- SigmaAldrich (USA)
- AppliChem (USA)

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Απομόνωση και πολλαπλασιασμός τμημάτων της αλληλουχίας cDNA του HIF-1α με PCR

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA in vitro, με σκοπό τα προϊόντα αυτά να ληφθούν σε σημαντική ποσότητα. Για τη μέθοδο αυτή απαιτείται να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που θέλουμε να ενισχύσουμε, ώστε να σχεδιαστούν κατάλληλα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια DNA για να χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές (primers). Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί ως προς τη μία αλυσίδα του δίκλωνου DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε (εκμαγείο). Έτσι, καθίσταται δυνατός ο υβριδισμός τους με τις αλυσίδες του DNA-στόχου και ο πολλαπλασιασμός των γονιδιακών αλληλουχιών που οριοθετούνται από τους 2 εκκινητές με τη χρήση θερμοανθεκτικών πολυμερασών.

Η αντίδραση αποτελείται από τρία στάδια:

- αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου (denaturation)
- υβριδισμός των εκκινητών στο DNA-εκμαγείο (annealing)
- επιμήκυνση των εκκινητών (extention)

Η αποδιάταξη γίνεται με θέρμανση του εκμαγείου (~95°C). Ακολουθεί η ψύξη του μίγματος της αντίδρασης για να επιτευχθεί η πρόσδεση των εκκινητών στους κλώνους του εκμαγείου (~50-60 °C). Τέλος, γίνεται επώαση του μείγματος στους 72°C, ώστε να δράσει η θερμοανθεκτική πολυμεράση και να επιμηκύνει τους εκκινητές. Η διαδικασία αυτή που περιγράφηκε αποτελεί έναν πλήρη κύκλο μιας αντίδρασης PCR. Σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται, ενώ απαιτούνται περίπου 20-30 κύκλοι για να ολοκληρωθεί η διαδικασία και να ενισχυθεί αποτελεσματικά το επιθυμητό θραύσμα του DNA από το εκμαγείο. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα πολλαπλασιασμού του DNA in vitro (χωρίς τη χρήση ζωντανών κυττάρων) σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (λίγες ώρες).

Στην παρούσα μελέτη η PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της περιοχής του cDNA του HIF-1α που κωδικοποιεί για το τμήμα των αμινοξέων 348-616.

Το μίγμα της αντίδρασης ήταν το εξής:

- 60 ng από το εκμαγείο pGEX-4T1HIF-1α (1-652) για το τμήμα που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία 348-616
- 0,2 mM dNTPs

- 1x Thermopol Vent Buffer
- 2,5 units Vent πολυμεράση
- 10 pmol πρόσθιου εκκινητή (forward primer)
- 10 pmol οπίσθιου εκκινητή (reverse primer)
- H₂O έως ότου ο όγκος της αντίδρασης γίνει ίσος με 50 μl

Οι συνθήκες στις οποίες το παραπάνω ζεύγος εκκινητών ενισχύει τις επιθυμητές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του HIF-1α, βελτιστοποιήθηκαν και είναι οι ακόλουθες:

Ζεύγος εκκινητών HIF1348F/HIF1616R	
Αρχική αποδιάταξη	95°C, 5 min
Αποδιάταξη	95 °C, 30 sec
Υβριδοποίηση	54°C, 30 sec
Πολυμερισμός	72°C, 1 min
Τελική επέκταση	72°C, 5 min

Πίνακας 2: Βελτιστοποίηση των συνθηκών ενίσχυσης των ζευγών εκκινητών HIF1348F/HIF1616R

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1% και καθαρισμός των προϊόντων της PCR με τη χρήση του kit της εταιρείας Isolation II PCR and Gel Kit (Bioline).

3.2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ηλεκτροχημική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μεγαλομορίων, μεταξύ άλλων, και DNA. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων (το DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που διαθέτει) σε υγρό μέσο (ρυθμιστικό διάλυμα), υπό επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου καθορίζει την απόσταση που διανύουν τα φορτισμένα μόρια σε δεδομένο χρόνο, άρα το πόσο καλά θα διαχωριστούν. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από παράγοντες όπως είναι το μέγεθός τους, η συγκέντρωση του πηκτώματος και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος.

Η ανίχνευση των τμημάτων DNA στο πήκτωμα γίνεται με τη χρήση ουσιών που δεσμεύονται στο DNA και φθορίζουν παρουσία ακτινοβολίας, όπως είναι το βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο διαθέτει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο ορατό φάσμα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αгарόζης με συγκέντρωση 1%, ρυθμιστικό διάλυμα

TAE (40 mM M Tris, 20 mM οξικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8), και βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,5 µg/ml. Επιπλέον, πριν την φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια του πηκτώματος τα δείγματα DNA αναμιγνύονται με πυκνό διάλυμα (Loading Buffer). Η σύσταση του πυκνού διαλύματος φορτώματος είναι η εξής:

- Γλυκερόλη 12,5 % v/v
- Μπλε της βρωμοφαινόλης 0,42 % w/v
- Κυανούν του ξυλενίου 0,42 % w/v

3.2.3 Κλωνοποίηση του τμήματος cDNA που κωδικοποιεί την αμινοξική αλληλουχία 348-616 του HIF-1α σε πλασμιδιακό φορέα

3.2.3.1 Πέψεις

Δύο τμήματα DNA στα οποία έχει γίνει πέψη με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο μπορούν να συνδεθούν προσωρινά λόγω της υβριδοποίησης που θα λάβει μεταξύ των άκρων τους (κολλώδη άκρα). Η σύνδεση αυτή δύναται να μονιμοποιηθεί με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών. Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί είναι ομοιοπολικοί δεσμοί και η δημιουργία τους επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου λιγάση του DNA (DNA ligase). Η παραπάνω διαδικασία μπορεί, λοιπόν, να χρησιμοποιηθεί για την σύνδεση ενός κομμένου πλασμιδιακού φορέα με οποιοδήποτε τμήμα DNA με συμβατά κολλώδη άκρα, ως πρώτο βήμα για εφαρμογές κλωνοποίησης. Στην παρούσα μελέτη, τόσο το τμήμα του HIF-1α όσο και ο πλασμιδιακός φορέας υπέστησαν πέψη με χρήση του περιοριστικού ενζύμου BamHI.

Για το DNA-ένθεμα και τον πλασμιδιακό φορέα τα μίγματα της πέψης ήταν τα εξής:

- 887 ng DNA ενθέματος ή 4 µg pGEX-4T1-HIF-1α
- 1x τελική συγκέντρωση Cutsmart® Buffer (50 mM Οξικό Κάλλιο, 20 mM Tris-οξικό, 10 mM οξικό μαγνήσιο, 100 µg/ml BSA, pH 7.9)
- 20 units BamHI-HF
- H₂O ως τελικό όγκο τα 50 µl

Κατά την αναμονή ~3,5 h για την ολοκλήρωση των παραπάνω αντιδράσεων πέψης με BamHI έγινε επώαση του πλασμιδιακού φορέα με 10 units αλκαλικής φωσφατάσης (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIAP/CIP) στο μέσον της επώασης, με σκοπό την απομάκρυνση των φωσφορικών ομάδων από τα 5' άκρα του πλασμιδιακού φορέα, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε επανένωση των άκρων του. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση όλων των δειγμάτων σε πήκτωμα αгарόζης 1%, στα 100 V. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε λυχνία UV για να

καταστούν ορατές οι ζώνες του DNA που μας ενδιαφέρουν και έγινε αποκοπή αυτών από το πήκτωμα.

3.2.3.2 Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο του kit «Isolate II PCR and Gel Kit» της εταιρείας Bioline για gel extraction κατέστη εφικτή η ανάκτηση του DNA του ενδιαφέροντός μας (ένθεμα και πλασμιδιακός φορέας) από το πήκτωμα. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε καθαρό χειρουργικό νυστέρι για την αποκοπή των τμημάτων πηκτώματος αγαρόζης που περιέχουν το επιθυμητό DNA. Απομακρύνθηκε η περίσσεια αγαρόζης και κατόπιν το επιθυμητό τμήμα της πηκτής τοποθετήθηκε σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου (τύπου erpendorf) και ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό με σκοπό τον καθορισμό του βάρους του (σε mg). Ακολούθως, στο σωληνάκι με το κομμάτι του πηκτώματος προστέθηκαν ορισμένα μl «Binding Buffer CB» του kit της εταιρείας Bioline ανάλογα με τη μάζα του εκάστοτε κομματιού πηκτώματος που εξήχθησε (αναλογία μάζας πηκτώματος/όγκος Binding Buffer CB: 1:2) με σκοπό την διαλυτοποίηση της αγαρόζης. Το διάλυμα αυτό περιέχει έναν χαοτροπικό παράγοντα που είναι η υδροχλωρική γουανιδίνη. Έπειτα έγινε επώαση του δείγματος στους 50°C για 5-10 λεπτά με ενδιάμεσες έντονες αναδεύσεις μέχρι το κομμάτι της πηκτής να διαλυθεί πλήρως. Εν συνεχεία, το δείγμα με το DNA φορτώθηκε σε ειδική στήλη ώστε το DNA να προσδεθεί στη μεμβράνη της στήλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 1 λεπτού στα 2415 g και το έκλουσμα απορρίφθηκε. Ακολούθησε έκπλυση της στήλης με το διάλυμα «Wash Buffer CW» που περιέχει αιθανόλη για να διατηρηθεί η σύνδεση του DNA στη μεμβράνη. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση 1 λεπτού στα 8117 g. Το έκλουσμα απορρίφθηκε. Το στάδιο αυτό της έκπλυσης μπορεί να επαναληφθεί προαιρετικά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 1 λεπτού στα 8117 g με σκοπό να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη. Τέλος η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου (τύπου erpendorf) και προστέθηκαν 30 μl 10mM Tris-HCl pH 8.5 απευθείας πάνω στη μεμβράνη με σκοπό την έκλυση του DNA. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Τέλος έγινε φυγοκέντρηση 1 λεπτού στα 8117 g με σκοπό την παραλαβή του DNA. Το DNA συντηρήθηκε στους -20°C .

Εν συνεχεία, είναι απαραίτητη η ποσοτικοποίηση των τμημάτων DNA που θα χρησιμοποιηθούν. Για την ποσοτικοποίηση γίνεται ηλεκτροφόρηση γνωστού όγκου από το υπονήφιο ένθεμα, καθώς και από τον πλασμιδιακό φορέα.

3.2.3.3 Αντίδραση λιγάσης (ligation)

Για την αντίδραση λιγάσης το μείγμα της αντίδρασης περιείχε:

- Πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1 και ένθεμα cDNAτων αμινοξέων 348-616 του HIF-1α σε αναλογία 1:3
- 400 units λιγάση του DNA T4
- 1x τελική συγκέντρωση Buffer λιγάση του DNA T4 (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7.5)
- H₂O ως τελικό όγκο 20 μl

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ελέγχου (control) με τον κομμένο και αποφωσφορυλιωμένο φορέα pGEX-4T1, απουσία ενθέματος και απουσία/παρουσία λιγάσης. Η αντίδραση λιγάσης έγινε με ολονύκτια επώαση στους 16°C.

3.2.3.4 Παρασκευή επιδεκτικών για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων.

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για τη δημιουργία βακτηριακών κυττάρων που μπορούν εύκολα να προσλάβουν πλασμιδιακούς φορείς με κλωνοποιημένο ένθεμα ετερόλογου DNA. Η διαδικασία διενεργείται με τη χρήση CaCl₂. Η προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου υποβοηθά τη πρόσδεση του εξωγενούς DNA στους λιποπολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηριακών κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα θετικά φορτισμένα ιόντα Ca⁺², προσελκύουν τόσο τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό του DNA όσο και τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες στο στρώμα των λιποπολυσακχαριτών.

Αρχικά εμβολιάστηκαν 5ml διαλύματος TYM (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0,1 M NaCl, 10 mM MgSO₄) με βακτήρια *E.Coli* BL21-RIL (βρίσκονται σε διάλυμα αποθήκευσης με γλυκερόλη στους -80°C), παρουσία χλωραμφενικόλης (αραίωση 1:1000) ή *E.Coli* TOP10 παρουσία στρεπτομυκίνης (αραίωση 1:1000). Η καλλιέργεια επώαστηκε για 12-16 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση. Από αυτήν την καλλιέργεια εμβολιάστηκε ορισμένος όγκος θρεπτικού υλικού TYM ώστε να επιτευχθεί αραίωση 1:100. Η νέα καλλιέργεια επώαστηκε για 2-3 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση. Κατόπιν εμβολιάστηκαν με ορισμένο όγκο από την καλλιέργεια αυτή, συγκεκριμένος όγκος θρεπτικού μέσου TYM, το οποίο δεν περιέχει αντιβιοτικό με σκοπό να επιτευχθεί αραίωση 1:200. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει OD₆₀₀ = 0.35 – 0.4. Το εύρος αυτό είναι σημαντικό διότι αντιστοιχεί στην εκθετική φάση της σιγμοειδούς καμπύλης της κινητικής βακτηριακής ανάπτυξης όπου τα βακτήρια είναι ακόμα μεταβολικά ενεργά και δεν έχουν εισέλθει στη στατική φάση όπου ξεκινά η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών του μέσου ανάπτυξης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε 3000 g για 10 λεπτά στους 4°C και αιωρήθηκαν σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος TFB-I

(100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% γλυκερόλη, 30 mM CH₃COOK, pH 7), και επώστηκαν στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 3000 g και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος TFB-II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 20% γλυκερόλη, pH 7). Το αιώρημα επώστηκε σε πάγο για 60 min και τελικά μοιράστηκε σε κλάσματα των 100 μl σε σωλήνες μικροφυγοκέντρου (τύπου erppendorf) που αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

3.2.3.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Ο μετασχηματισμός είναι μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες στη μοριακή βιολογία και περιλαμβάνει τη γενετική τροποποίηση ενός κυττάρου, η οποία προκύπτει από την άμεση πρόσληψη εξωγενούς γενετικού υλικού, από τον περιβάλλοντα χώρο διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Προκειμένου ο μετασχηματισμός να είναι επιτυχής, απαιτείται τα βακτηριακά κύτταρα να είναι επιδεκτικά στην πρόσληψη ξένου νουκλεϊκού οξέος. Επιπρόσθετα, ο μετασχηματισμός αποτελεί έναν από τους τρόπους οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς στα βακτήρια και συνεπώς αποτελεί μία φυσιολογική τους ιδιότητα.

Στη παρούσα εργασία μετασχηματίστηκαν επιδεκτικά κύτταρα BL21-RIL και E.Coli TOP10. Σε 50 μl του αιωρήματος των δεκτικών βακτηρίων προστέθηκε το πλασμιδιακό DNA (50-100 ng DNA). Τα κύτταρα επώστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ για 1-2 λεπτά στους 42°C. Κατόπιν προστέθηκε θρεπτικό υλικό 0,5 ml L.B. (LURIABROTH-Tryptone 1% w/v, Yeast extract 0.5% w/v, NaCl 1%) και ακολούθησε επώαση των βακτηρίων για 30-45 λεπτά στους 37°C. Το στάδιο αυτό εξυπηρετεί την ανάρρωση των βακτηριακών κυττάρων από τις θερμοκρασιακές εναλλαγές και δίνεται στα βακτήρια ο χρόνος να εκφράσουν τα ένζυμα που θα μεταβολίσουν το αντιβιοτικό επιλογής. Μετά από φυγοκέντρηση 5 λεπτών σε 1073 g αφαιρέθηκε το μεγαλύτερο μέρος του υπερκειμένου και έγινε επαναιώρηση των κυττάρων στον εναπομείναντα όγκο (λιγότερο από 100 μl). Όλη η ποσότητα των επαναιωρημένων κυττάρων επιστρώθηκε στην επιφάνεια τρυβλίου με θρεπτικό υλικό LB-άγαρ (2% άγαρ) που περιέχει 100 μg/ml αμπικιλίνη, ως αντιβιοτικό επιλογής στην περίπτωση των TOP10 βακτηριακών κυττάρων. Ωστόσο στην περίπτωση των BL21-RIL δεν επιστρώθηκαν όλα τα επαναιωρημένα βακτήρια αλλά ένα μικρό μέρος της ποσότητας αυτών. Τα τρυβλία επώστηκαν στους 37°C για 16-18 ώρες.

Την επόμενη μέρα εμβολιάστηκαν ίσοι όγκοι (3 ml) L.B παρουσία αμπικιλίνης, έκαστος με μία διαφορετική βακτηριακή αποικία στην περίπτωση χρήσης των TOP10 βακτηριακών κυττάρων. Οι υγρές καλλιέργειες επώστηκαν ολονύκτια στους 37°C για 16-18 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (~250 rpm). Στην περίπτωση χρήσης των BL21-RIL βακτηρίων

εμβολιάστηκαν μικροί όγκοι L.B (20 ml) με μία βακτηριακή αποικία έκαστος παρουσία αμπικιλίνης και χλωραμφαινικόλης. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν ολονύκτια στους 37°C για 16-18 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (~250 rpm).

3.2.3.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (mini-preparation)

Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι η πλέον επιθυμητή και προτιμώμενη για απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα. Η διαδικασία έχει ως εξής: αρχικά χρησιμοποιούνται μικρές (3 ml) καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων που περιέχουν το προς απομόνωση πλασμιδιακό DNA. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 1-2 λεπτά στις 4000 g και το ίζημα επαναιωρείται σε 150 διαλύματος TE (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA) στο οποίο έχει προστεθεί 0,1 mg/ml RNase A. Το EDTA ως χηλικός παράγοντας δεσμεύει δισθενή κατιόντα τα οποία δρουν σαν συμπαράγοντες νουκλεασών που μπορεί να πέσουν το προς απομόνωση πλασμιδιακό DNA. Επίσης συμβάλλει στην αποσταθεροποίηση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Η RNase συμβάλλει στην αποικοδόμηση του RNA κατά τη λύση των κυττάρων. Ακολούθως προστίθενται 200 µl διαλύματος λύσης κυττάρων TENS (200 mM NaOH, 1% SDS). Το απορρυπαντικό SDS συνεισφέρει στη διαλυτοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) βοηθά στη θραύση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ παράλληλα διαταράσσει τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA μετατρέποντας το χρωμοσωμικό και το προς απομόνωση πλασμιδιακό DNA σε μονόκλωνο. Ακόμα το SDS αποδιατάσσει τις περισσότερες πρωτεΐνες των βακτηρίων. Ακολούθως προστίθενται 150 µl διαλύματος εξουδετέρωσης 3 M CH₃COONa ή CH₃COOK pH 5,2. Το διάλυμα αυτό μειώνει την αλκαλικότητα του δείγματος. Υπό αυτές τις συνθήκες οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του μονόκλωνου DNA επανασχηματίζονται και έτσι το μονόκλωνο DNA μετατρέπεται σε δίκλωνο. Ωστόσο μόνο το πλασμιδιακό DNA που είναι μικρού μεγέθους αναδιατάσσεται σε αντίθεση με το χρωμοσωμικό το οποίο παραμένει μονόκλωνο. Ενώ λοιπόν το δίκλωνο DNA είναι διαλυτό, το μονόκλωνο χρωμοσωμικό DNA, το SDS και οι αποδιαταγμένες κυτταρικές πρωτεΐνες συσσωματώνονται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων για να σχηματίσουν ένα λευκό ίζημα. Ακολούθως, φυγοκέντρωση σε 10.000 g για 10 λεπτά οδηγεί στο διαχωρισμό του προαναφερθέντος λευκού ιζήματος από το διαλυμένο πλασμιδιακό DNA το οποίο εμφανίζεται στο υπερκείμενο. Το υπερκείμενο αξιοποιήθηκε ως εξής: μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου (τύπου eppendorf), κατακρημνίστηκε με προσθήκη 100% ισοπροπανόλη, ακολούθως μεταφέρθηκε στους -20 °C για 30 min και έπειτα αφού έγινε φυγοκέντρωση σε 12.000 g για 10 λεπτά απομακρύνθηκε η ισοπροπανόλη και έγινε επαναιώρηση του ιζήματος (πλασμιδιακό DNA) σε 20-30 µl απιονισμένου H₂O.

3.2.3.7 Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (έλεγχος εισαγωγής ενθέματος και έλεγχος προσανατολισμού)

Το προς ανάλυση πλασμίδιο υποβλήθηκε σε πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για να διαπιστωθεί η παρουσία του ενθέματος και ο προσανατολισμός με τον οποίο εισήχθη αυτό στον πλασμιδιακό φορέα. Για να διαπιστωθεί η παρουσία του ενθέματος έγιναν πέψεις με το ένζυμο BamHI, ενώ για τον προσανατολισμό χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο PstI. Συγκεκριμένα οι αντιδράσεις πέψεις περιείχαν:

- 2 µg από κάθε πλασμίδιο
- 1x τελική συγκέντρωση Cutsmart® Buffer
(50 mM Οξικό Κάλιο, 20 mM Tris-Οξικό, 10 mM Οξικό Μαγνήσιο, 100 µg/ml BSA, pH 7,9)
- 4 units από κάθε ένζυμο
- H₂O μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 20µl

Οι πέψεις έγιναν στους 37°C για 1 ώρα και ακολούθησε έλεγχος με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.2.4 Υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HIF-1α 348-616/530-826/652-826

Η έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στόχου βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του καταστολέα lac, του υβριδικού tac υποκινητή. Η επαγωγή της έκφρασης γίνεται με προσθήκη ενός χημικού ανάλογου της λακτόζης/αλλολακτόζης, του IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), στη καλλιέργεια. Το IPTG έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται και να σταματάει τη δράση του καταστολέα lac, χωρίς όμως να μεταβολίζεται από τα ένζυμα του lac οπερονίου, παραμένοντας έτσι σταθερό στη συγκέντρωση που προστέθηκε στη καλλιέργεια.

Από την αρχική καλλιέργεια των 20 ml εμβολιάστηκαν 4 ml σε 400 ml L.B. και επωάστηκαν στους 37°C για 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (~250 rpm). Η επώαση διακόπηκε όταν η ανάπτυξη των βακτηρίων έφτασε στο μέσο της φάσης εκθετικής αύξησης (O.D.₆₀₀= 0.4-0.6). Κρατήθηκε 1 ml δείγμα για έλεγχο (-IPTG) και στην υπόλοιπη καλλιέργεια προστέθηκαν 200 µl IPTG 1 M (τελική συγκέντρωση 0,5 mM) και ακολούθησε επώαση στους 27°C υπό ανακίνηση για 2 ώρες. Κρατήθηκε 1 ml δείγμα για έλεγχο της επαγωγής (+IPTG). Τα δείγματα – και + IPTG φυγοκεντρήθηκαν για 4 λεπτά σε 1677 g. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 30 µl πυκνού Sample buffer (200 mM Tris-HCl pH 6,8, 400 mM DTT, 8% SDS, 0.4% μπλε της βρωμοφαινόλης, 40% γλυκερόλη,) και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Η υπόλοιπη καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε σε ψυχόμενη υπερφυγόκεντρο για 20 λεπτά σε 3795 g στους 4°C. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε αποστειρωμένο H₂O. Το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε πάλι για 15 λεπτά σε 3795 g και 4°C. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύτηκε στους -20°C.

3.2.5 Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

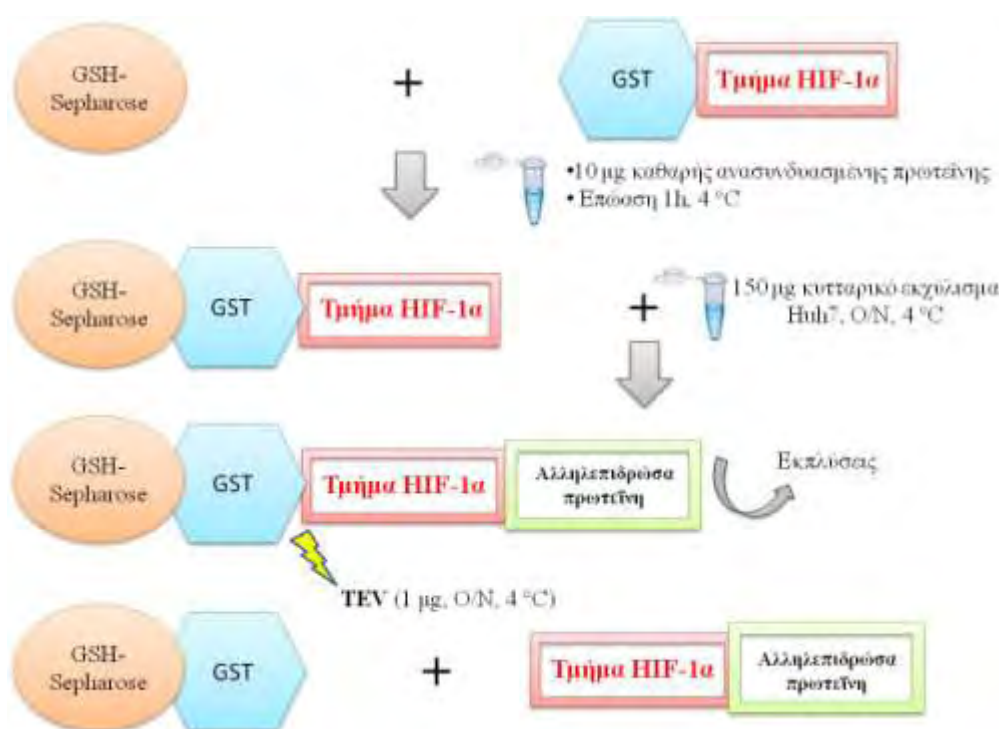
Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 8 ml διάλυμα λύσης (Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης: 20 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 5 mM DTT, 1 mM PMSF). Τα αιωρημένα κύτταρα, επωαζόμενα σε πάγο, υποβλήθηκαν σε κατεργασία με υπερήχους για 5 λεπτά (20 sec/min, amplitude 60, VibraCell, Sonics and Materials Inc) για να διαρρηχθούν οι κυτταρικές μεμβράνες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 17516 g 4°C για 40 λεπτά. Κρατήθηκαν 50 μl δείγματος υπερκειμένου (supernatant) για ανάλυση πρωτεϊνών και το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση και καθαρισμό της υπερεκφρασμένης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Στο ίζημα προστέθηκαν σταδιακά 8 ml διαλύματος λύσης. Στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν και κρατήθηκαν 50 μl δείγματος για ανάλυση πρωτεϊνών.

Ο καθαρισμός μιας πρωτεΐνης από ένα πρωτεϊνικό διάλυμα μπορεί να επιτευχθεί με βάση την εξειδικευμένη και αντιστρεπτή δέσμευση της, πάνω σε μόρια προσδέτες (ligands) που βρίσκονται καθηλωμένα πάνω σε κάποιο αδρανές υλικό χρωματογραφίας. Η έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών από τη στήλη επιτυγχάνεται είτε με τη διαβίβαση του ίδιου του προσδέτη ή μιας δομικά ανάλογης ένωσης του από τη στήλη προκαλώντας έτσι την εξασθένηση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του καθηλωμένου προσδέτη και της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει. Στην παρούσα μελέτη ο καθαρισμός της πρωτεΐνης σύντηξης έγινε με στήλη αχιστείας που περιέχει γλουταθειόνη καθηλωμένη σε σεφαρόζη (GSH-Sepharose). Έτσι, ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης από το εκχύλισμα γίνεται δυνατός χάρη στην αλληλεπίδραση της δεσμευμένης γλουταθειόνης με την GST που βρίσκεται σε σύντηξη με τις πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με την διαβίβαση διαλύματος γλουταθειόνης σε περίσσεια. Σφαιρίδια GSH-Sepharose εξισορροπήθηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε για τη λύση των βακτηριακών κυττάρων. Σφαιρίδια 200 μl αναμίχθηκαν με 5 ml διαλύματος λύσης με ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C. Έγιναν 3 πλύσεις εξισορρόπησης των 10 λεπτών ακολουθούμενες από φυγοκεντρήσεις 3 λεπτών 1500 g και αλλαγή διαλύματος λύσης. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε όλο το διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα στην εξισορροπημένη στήλη σφαιριδίων GSH-Sepharose και το μείγμα επώαστηκε για 1 ώρα με ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με το ίδιο διάλυμα λύσης και ακολούθησε η έκλυση των πρωτεϊνών. Για τις εκλούσεις παρασκευάστηκε διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης 10 mM σε διάλυμα 25 mM Tris-

HCl pH 8,5. Προστέθηκαν 500 µl διαλύματος γλουταθειόνης στα σφαιρίδια και επωάστηκαν για 3 λεπτά στους 4°C με ανάδευση κυκλικής τροχιάς. Μετά από φυγοκέντρηση 3 λεπτών 1500 g το υπερκείμενο αποτελεί το έκλουσμα που περιέχει την καθαρισμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για να παραληφθεί τόσο το δεύτερο όσο και το τρίτο έκλουσμα. Τέλος, μέσω της μεθόδου Bradford υπολογίστηκε η συγκέντρωση του καθενός GST-HIF-1α χιμαιρικού πεπτιδίου (µg/µl) και κατ'έπекταση και η ποσότητα (µg) του καθενός από αυτά στο συνολικό όγκο της πρώτης έκλουσης (GST-HIF1α 530-826: 553 µg, GST-HIF-1α 348-616: 552 µg, GST-HIF1α 652-826: 1001 µg).

3.2.6 Δοκιμές συγκατακρήμνισης (in vitro pull down assay) πρωτεϊνών.

Η τεχνική της συγκατακρήμνισης είναι μια μέθοδος μελέτης πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης in vitro. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που αποτελεί το «δόλωμα» προσδέεται σε σφαιρίδια λόγω αγκιστείας του χιμαιρικού επιτόπου που φέρει και έτσι δημιουργείται μια σταθερή φάση. Επώση διαλυτού κυτταρικού εκχυλίσματος με το σύμπλοκο σταθερής φάσης έχει σαν αποτέλεσμα να συγκαθιζάνουν στα σφαιρίδια πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την υπό μελέτη πρωτεΐνη.



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση ενός πειράματος in vitro συγκατακρήμνισης

Στην παρούσα εργασία τμήματα της αλληλουχίας του HIF-1α (348-616, 530-826, 652-826) εκφρασμένα σε σύντηξη με GST, προσδέθηκαν σε σφαιρίδια. Συγκεκριμένα 30 µl εξισορροπήθηκαν με 3 πλύσεις των 10 λεπτών, με 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Hepes

pH7,5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1mM DTT, 0,1 mM PMSF), σε ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C. Ακολούθησε η πρόσδεση στα σφαιρίδια της στήλης 10 μg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με επώαση για 1 ώρα με τα σφαιρίδια σε ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C. Ακολούθησε μία δεκάλεπτη πλύση των σφαιριδίων με το διάλυμα λύσης.

Για τη παρασκευή του κυτταρικού εκχυλίσματος, καρκινικά κύτταρα Huh7 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm κορεσμένα κατά 90%. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο, πραγματοποιήθηκε έκπλυση με PBS, προστέθηκαν 150 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και έγινε επώαση για 15 min σε πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 20817 g για 30 λεπτά στους 4°C. Στο υπερκείμενο υπολογίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και 150 μg πρωτεΐνης μεταφέρθηκαν στους σωλήνες μικροφυγοκέντρου που περιείχαν τα σφαιρίδια με την προσδεδεμένη σε αυτά πρωτεΐνη GST-HIF-1α-348-616 ή -530-826 ή -652-826. Προστέθηκαν 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, το μείγμα αναδεύτηκε και επώαστηκε ολονύκτια σε ανάδευση κυκλικής τροχιάς στους 4°C.

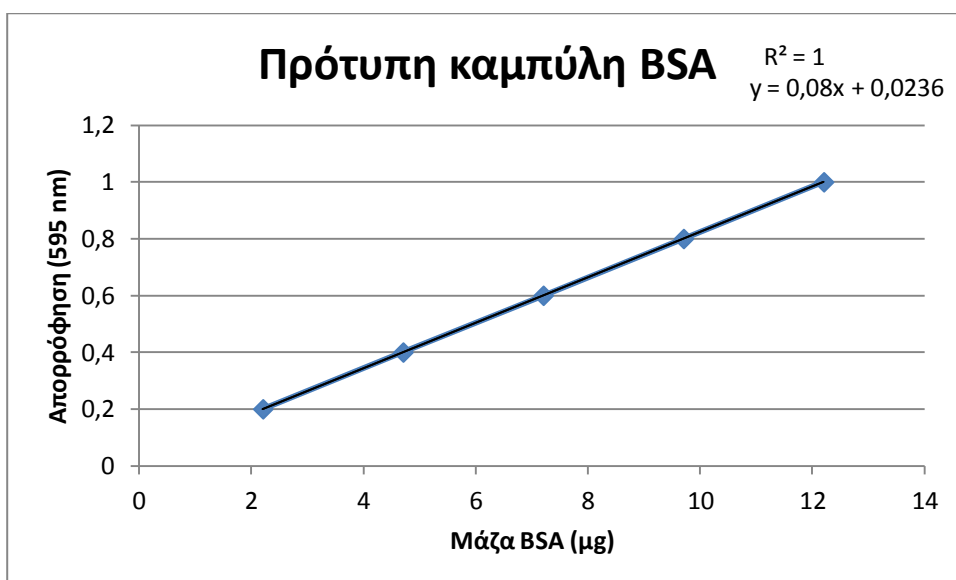
Την επόμενη μέρα έγιναν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με το διάλυμα λύσης. Μετά τις πλύσεις αφαιρέθηκε όλο το διάλυμα λύσης με λεπτή σύριγγα έπειτα από μια επιπλέον φυγοκέντρηση 9960 g για 1 λεπτό. Η έκλουση έγινε μέσω χρήσης της πρωτεάσης TEV. Η πρωτεάση TEV πρωτεολύει μεταξύ του επιτόπου GST και του εκάστοτε ανασυνδυασμένου πεπτιδίου απελευθερώνοντας το από την χημική του κατάσταση. Αρχικά, έγινε εξισορρόπηση των σφαιριδίων στο ρυθμιστικό διάλυμα όπου δρα βέλτιστα η πρωτεάση TEV (TEV Buffer). Πραγματοποιήθηκαν για αυτόν το σκοπό τρεις πλύσεις των 10 λεπτών με 500 μl TEV Buffer (50 mM Tris HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT). Μετά την τελευταία πλύση των σφαιριδίων πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (604 g, 1 min), απομακρύνθηκε το TEV Buffer, ξαναέγινε φυγοκέντρηση 12045 g για λιγότερο από 1 λεπτό και απομακρύνθηκε και η υπόλοιπη ποσότητα του TEV Buffer. Έπειτα, προστέθηκαν 50 μl TEV Buffer και ακολούθως 1 μg (4 μl, 0,25 μg/μl) πρωτεάσης TEV και ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 4°C.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως στα 10 μg των χημικών πεπτιδίων που προσδέθηκαν στη στήλη χρησιμοποιήθηκε σχετικά μεγάλη ποσότητα πρωτεάσης TEV (1 μg), διότι ένα μεγάλο μέρος του ενζύμου προσροφάται στα σφαιρίδια, και ένα μεγάλο μέρος του ενζύμου μπορεί να μην πρωτεολύσει λόγω δυσχέρειας στη προσέγγιση του υποστρώματος του, δεδομένου του γεγονότος ότι είναι σε διάλυμα ενώ το εκάστοτε χημικό πεπτίδιο δεσμευμένο σε ένα αδρανές υλικό. Επειδή όμως, η μεγάλη ποσότητα μπορεί να οδηγήσει σε μη ειδική πρωτεόλυση από την TEV η επώαση γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (4 °C) για τη μείωση της καταλυτικής της δραστηριότητας.

Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση των σωληναρίων μικροφυγοκέντρου (12045 g) και αφαίρεση του εκάστοτε εκλούσματος. Από τα εκλούσματα, 5 μ l κρατήθηκαν για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση και 5 μ l για SDS-PAGE και χρώση με AgNO_3 . Οι υπόλοιπες ποσότητες των εκλουσμάτων φυλάχτηκαν στους -20°C για να αναλυθούν με φασματοσκοπία μάζας. Τα δείγματα που κρατήθηκαν για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση ή χρώση με AgNO_3 αναμίχθηκαν με 1,7 μ l πυκνού διαλύματος Laemmli (Laemmli Buffer) (250 mM Tris-HCl, 9,2% SDS, 40% γλυκερόλη, 0,2% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης) και 0,2 μ l 1 M DTT και φυλάχτηκαν στους -20°C .

3.2.7 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

Η φασματοφωτομετρική-χρωματομετρική μέθοδος Bradford βασίζεται σε συγκεκριμένες ιδιότητες της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250. Ουσιαστικά, βασίζεται στον προσδιορισμό της αλλαγής χρώματος της εν λόγω χρωστικής από κόκκινο – καφέ σε μπλε κατά τη σύνδεσή της σε πρωτεΐνες, υπό όξινες συνθήκες. Η κόκκινη μορφή του αντιδραστηρίου Bradford δίνει τα ελεύθερα ηλεκτρόνιά της στις ιονισμένες ομάδες της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να αλλάζει η δομή της πρωτεΐνης και να εκθέτει τις υδρόφοβες περιοχές. Αυτές οι υδρόφοβες περιοχές φτιάχνουν δεσμούς van der Waals με τις μη πολικές περιοχές της χρωστικής σταθεροποιώντας τη μπλε μορφή της. Η χρωστική αυτή κάτω από όξινες συνθήκες παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm, ενώ παρουσία πρωτεϊνών σχηματίζει με αυτές ένα σύμπλοκο που απορροφά στα 595 nm. Το διάλυμα Bradford που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας Biorad. Από το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιούνται 200 μ l αραιωμένα με νερό σε τελικό όγκο 1 ml είτε σαν τυφλό, είτε με προσθήκη ορισμένης ποσότητας (μ l) διαλύματος πρωτεϊνών, για φωτομέτρηση στα 595 nm, όπου το σύμπλοκο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση. Ο συντελεστής απορρόφησης του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής παραμένει σταθερός για μεγάλο εύρος συγκέντρωσης και έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης μας με βάση την μετρούμενη οπτική πυκνότητα (O.D.). Ο υπολογισμός αυτός γίνεται με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA):



Εικόνα 16: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία.

3.2.8 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

Ο αναλυτικός διαχωρισμός μακρομορίων που επιτυγχάνεται με την ηλεκτροφόρηση, βασίζεται σε συγκεκριμένες αρχές της κίνησης φορτισμένων μακρομορίων κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα μετακίνησης (v) μακρομορίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (q) και το συντελεστή τριβής (f).

$$v = E \cdot q / f$$

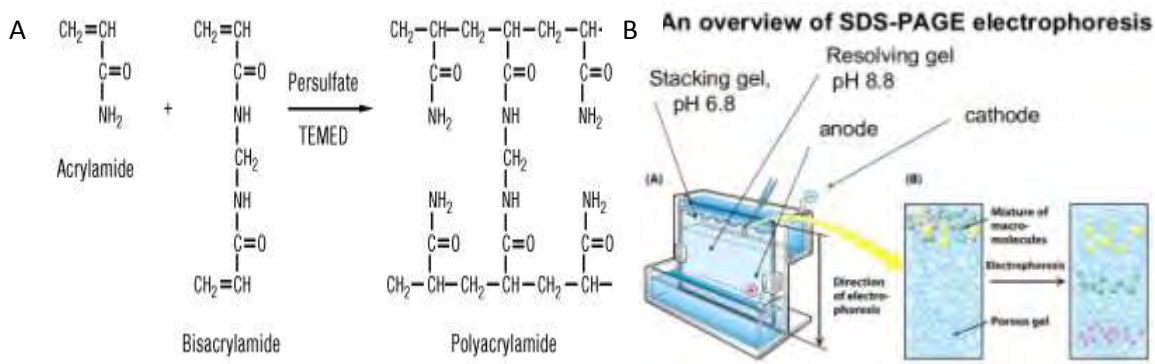
Η ηλεκτροστατική δύναμη $E \cdot q$ που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου μετακίνησης. Η σταθερά τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα (ιξώδες) του μέσου. Το πήκτωμα σαν μέσο ηλεκτροφόρησης λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, διευκολύνοντας τον διαχωρισμό με βάση το μοριακό βάρος και το σχήμα των μακρομορίων. Επίσης ο στερεός του χαρακτήρας αποτρέπει την τυρβώδη ροή που μπορεί να δημιουργηθεί από μικρές τοπικές μεταβολές της θερμοκρασίας.

Το πήκτωμα του πολυακρυλαμιδίου είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δι-ακρυλαμίδιο (MBA). Το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα

διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιαμέσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδιου και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειϊκού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται κυρίως με βάση διαφορές στο φορτίο (ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης), στη μάζα ή σε διάφορες άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων. Η συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση (SDS-PolyAcrylamideGel Electrophoresis, SDS-PAGE) γίνεται σε αποδιατακτικές συνθήκες και οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που σχηματίζει υδρόφοβους δεσμούς με τις πρωτεΐνες σε συγκεκριμένες κατά βάρος ποσότητες (1,4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Το SDS αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις προσδίδει επίμηκες σχήμα και καθαρό αρνητικό φορτίο. Το συνολικό φορτίο είναι ανάλογο του μοριακού βάρους ωστόσο, λόγω της ισοκατανομής του SDS, το φορτίο ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι κοινό. Προστίθεται επίσης διθειοθρεϊτόλη (DTT) που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση 5 λεπτά στους 97°C. Μετά από αυτή την κατεργασία η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών επηρεάζεται αποκλειστικά από το μοριακό τους μέγεθος. Έτσι, οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται γρήγορα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ οι μεγάλες καθυστερούν.

Η πηκτή πολυακρυλαμίδιου αποτελείται από δύο μέρη, το πήκτωμα διαχωρισμού – separating gel (7,5 cm ύψος, 1 mm πάχος) και το πήκτωμα επιστοιβαξης – stacking gel (2,5 cm ύψος). Οι θέσεις εισαγωγής δειγμάτων (διαδρομές) δημιουργούνται με τη βοήθεια πλαστικής οδοντωτής μήτρας η οποία αφαιρείται μετά τον πολυμερισμό της πηκτής. Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές των εταιριών BIO-RAD και HOEFER. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστίθενται πρώτα 5ml πηκτής διαχωρισμού με πυκνότητα σε πολυακρυλαμίδιο 10% και pH 8,8. Ακολούθως παρασκευάζεται και στοιβάζεται διάλυμα πηκτώματος επιστοιβαξης 4 ml, πυκνότητας πολυακρυλαμίδιου 4,5% και pH 6,8.



Εικόνα 17: Α) Σχηματικά αναπαράσταση του πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου. Β) Αναπαράσταση συσκευής ηλεκτροφόρησης και διαχωρισμού σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Αφού πήξει, το πήκτωμα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου καλύπτεται πλήρως με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer). Τα δείγματα και μίγμα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών πριν φορτωθούν στις θέσεις εισαγωγής δείγματος του πηκτώματος επιστοιβάξης, θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 97°C και φυγοκεντρούνται για σύντομο χρόνο (shortspin) σε 11337 g. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 120 V.

Παρατίθεται η χημική σύσταση των διαφόρων διαλυμάτων:

α) Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (separating gel buffer): 0,375 Tris-HCl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, **β)** Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοιβάξης (stacking gel buffer): 0,125 Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, **γ)** Μίγμα πηκτώματος διαχωρισμού (Separating gel): 10 % ακρυλαμίδιο/δίζ-ακρυλαμίδιο, 0,04% v/v APS, 0,1% v/v TEMED σε ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού, **δ)** Μίγμα πηκτώματος επιστοιβάξης (Stacking gel): ακρυλαμίδιο/δίζ-ακρυλαμίδιο, 0,0625% v/v APS, 0,1% v/v TEMED σε ρυθμιστικό διάλυμα Επιστοιβάξης, **ε)** Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer): 0,05 M Tris, 0,38 M γλυκίνη, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, pH 8,3, **ζ)** Διάλυμα δειγμάτων (Laemmli buffer): 62,5 mM Tris-HCl, 2,3 % SDS, 10 % γλυκερόλη, 0,05 % w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 25 mM DTT.

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου ανιχνεύθηκαν/μονιμοποιήθηκαν με:

- Χρώση με υδατικό διάλυμα 0,1% w/v AgNO₃ (νιτρικό άργυρο)
- Χρώση με Coomassie brilliant blue σε υδατικό διάλυμα που περιέχει: 45% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 3 g/L Coomassie brilliant blue
- Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

3.2.9 Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο (AgNO_3).

Η χρώση ενός πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με AgNO_3 επιτρέπει την ανίχνευση των πρωτεϊνικών μορίων τα οποία έχουν διαχωριστεί σε αυτό μετά από ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Το πλεονέκτημα της εν λόγω χρώσης είναι η μεγάλη ευαισθησία που προσφέρει ο AgNO_3 , γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων πρωτεϊνών, της τάξης των ng (νανογραμμαρίων).

Αρχικά το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπέστη μία διαδικασία μονιμοποίησης (fixation) των πρωτεϊνών σε αυτό με διάλυμα 50% v/v CH_3OH και 10% v/v CH_3COOH για τουλάχιστον μία ώρα υπό ανάδευση. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν δύο δεκάλεπτες πλύσεις του πηκτώματος με απιονισμένο νερό και έπειτα το πήκτωμα παρέμεινε ολονύκτια σε απιονισμένο νερό.

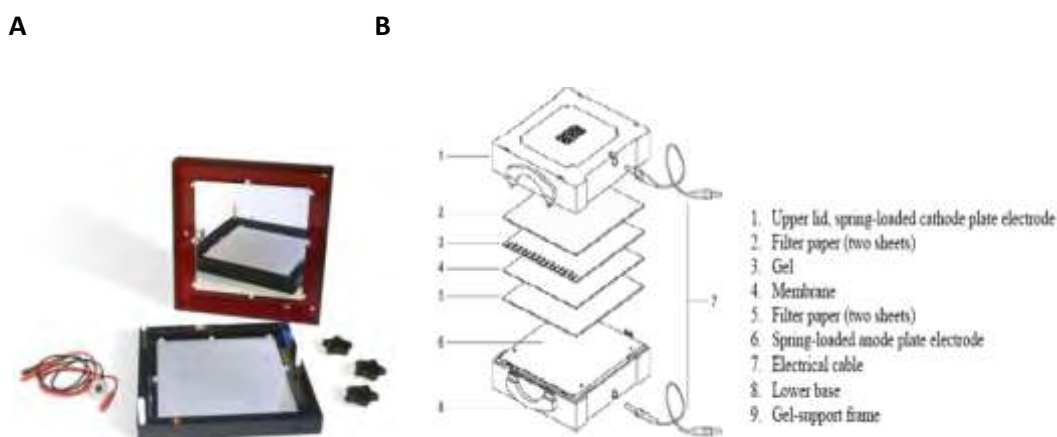
Την επόμενη ημέρα παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα DTT (τελική συγκέντρωση 64 μM). Έπειτα πραγματοποιήθηκε εμβάπτιση του πηκτώματος στο διάλυμα και ανάδευση αυτού για τουλάχιστον 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το διάλυμα DTT απορρίφθηκε και το πήκτωμα χωρίς να εκπλυθεί, εμβάπτιστηκε σε διάλυμα AgNO_3 περιεκτικότητας 0,1% w/v υπό ανάδευση για τουλάχιστον 30 λεπτά. Έπειτα το πήκτωμα ξεπλύθηκε γρήγορα 2 φορές με απιονισμένο νερό και ακολούθως προστέθηκε σταδιακά ήδη παρασκευασμένο διάλυμα εμφάνισης/ανάπτυξης (developer, 3% w/v Na_2CO_3 , 0,08% v/v HCHO) με παράλληλη ανάδευση μέχρι την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών. Ακολούθως, με ήδη παρασκευασμένο διάλυμα αναστολής της εμφάνισης/ανάπτυξης (50% CH_3OH και 10% v/v CH_3COOH) ξεπλύθηκε το πήκτωμα για τουλάχιστον 15-20 λεπτά με παράλληλη ανάδευση. Τέλος πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές δεκάλεπτες εκπλύσεις του πηκτώματος με απιονισμένο νερό και έπειτα το πήκτωμα συντηρήθηκε σε αυτό.

3.2.10 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοανίχνευση.

Η ανοσοαποτύπωση είναι μια αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μια μεμβράνη και τον εντοπισμό τους με ειδικά για αυτές αντισώματα. Η ηλεκτρομεταφορά βασίζεται στη κίνηση των αρνητικά φορτισμένων (υπό τη μορφή συμπλόκου με το SDS) πρωτεϊνών από τη πηκτή προς το θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς. Κατά τη κίνηση αυτή οι πρωτεΐνες παγιδεύονται και αποτυπώνονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι διάφορες καθηλωμένες πρωτεΐνες φέρουν αντιγονικούς επίτοπους που αναγνωρίζονται από εξειδικευμένα αντισώματα. Αφού συνδεθεί το πρώτο αντίσωμα στη πρωτεΐνη, γίνεται χρήση ενός δευτερεύοντος αντισώματος που αναγνωρίζει και δεσμεύει τις σταθερές περιοχές του πρώτου. Επιπλέον το αντίσωμα αυτό είναι τροποποιημένο ώστε να βρίσκεται σε σύνδεση με ένα ένζυμο-δείκτη, όπως η υπεροξειδάση του

χρένου, το οποίο όταν δρα πάνω σε ένα εξωγενώς χορηγούμενο υπόστρωμα δίνει μια αντίδραση χημειοφωταύγειας, φανερώνοντας έτσι τη ζώνη της πρωτεΐνης-αντιγόνου

Η ηλεκτρομεταφορά της πρωτεΐνης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιτυγχάνεται σε υγρό περιβάλλον, όπου όλα τα επιμέρους υλικά έχουν εμποτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer). Στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, πάνω στη πλάκα όπου βρίσκεται ο θετικός πόλος, τοποθετούνται με τη σειρά:



Εικόνα 18: Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε σχεδόν υγρό περιβάλλον (Semi-Dry Transfer). A) Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε peqlab® Semi-Dry Blotter. B) Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

- | | |
|------------------------------|---|
| | Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς
(Transfer Buffer) |
| • 2 χαρτιά Whatman 3MM | |
| • η πηκτή | 125 mM Tris-Borate (pH 8,5) |
| • η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης | 0,2% SDS |
| • 2 χαρτιά Whatman 3MM. | 0,5 mM DTT |

Καθένα από τα παραπάνω μέρη επιστρώνεται το ένα πάνω στο άλλο με ιδιαίτερη προσοχή στο να μη δημιουργούνται φυσαλίδες μεταξύ τους, καθώς αυτό θα παρεμπόδιζε τη ροή του ηλεκτρικού ρεύματος. Η πηκτή τοποθετείται προσανατολισμένη προς τον αρνητικό πόλο. Η ηλεκτρομεταφορά γίνεται σε συνθήκες 10 V για 70 λεπτά. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο peqlab® Semi-Dry Blotter (VWR).

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτρομεταφοράς η μεμβράνη βάφεται με τη χρωστική PonceauS (2% Ponceau, 30% τριχλωρο-οξικό οξύ, 30% σουλφοσαλικυλικό οξύ), έτσι ώστε να ελεγχθεί η

αποτύπωση. Σημειώνονται οι ζώνες του μάρτυρα με μολύβι και ξεβάφουμε τη μεμβράνη με απιονισμένο νερό και διάλυμα 1x PBS- 0.1% Tween 20.

Για την μέθοδο της ανοσοανίχνευσης, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τις αποτυπωμένες πρωτεΐνες εμβαπτίζεται υπό ανάδευση για 1 ώρα σε διάλυμα κορεσμού. Αυτό αποτελείται από 5% αποβουτυρωμένο γάλα σκόνη σε διάλυμα 1x PBS - 0.1% Tween 20. Η καζεΐνη του γάλακτος προσδένεται σε βαθμό κορεσμού σε μη-ειδικές θέσεις δέσμησης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και βοηθά στην αποφυγή όλων των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων του αντισώματος με τη μεμβράνη. Κατόπιν η μεμβράνη επώάζεται με το αντίστοιχο πρώτο αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε διάλυμα κορεσμού ή μόνο 1x PBS – 0.1% Tween 20. Η επώαση γίνεται υπό ανάδευση στους 4°C για 16 ώρες. Μετά την επίδραση του 1^{ου} αντισώματος η μεμβράνη υπόκειται σε 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου με 1x PBS – 0.1% Tween 20. Στη συνέχεια γίνεται επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το 2^ο αντίσωμα έναντι στις ανοσοσφαιρίνες IgG κουνελιού ή ποντικού αραιωμένο σε διάλυμα κορεσμού. Μετά τη σύνδεση του 2^{ου} αντισώματος η μεμβράνη υπόκειται σε 3 πλύσεις των 5 λεπτών. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών προϋποθέτει την αντίδραση χημειοφωταύγειας κατά την οποία η υπεροξειδάση σε αλκαλικό περιβάλλον καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης κάτω από την επίδραση του H₂O₂, με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων. Προετοιμάζεται διάλυμα που περιέχει 10 ml διαλύματος λουμινόλης (1,25 mM λουμινόλης σε Tris-ClpH 8,5), 30 μl H₂O₂ και 100 μl κουμαρικό οξύ (6,8 mM κουμαρικού οξέος σε DMSO) που δρα σαν ενισχυτής της αντίδρασης. Το διάλυμα επώάζεται για 1-2 λεπτά με τη μεμβράνη για να γίνει η αντίδραση. Στη συνέχεια το σήμα χημειοφωταύγειας ανιχνεύεται και φωτογραφίζεται με τη χρήση ειδικού ηλεκτρονικού εξοπλισμού (Uvitec Cambridge).

3.2.11 Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών.

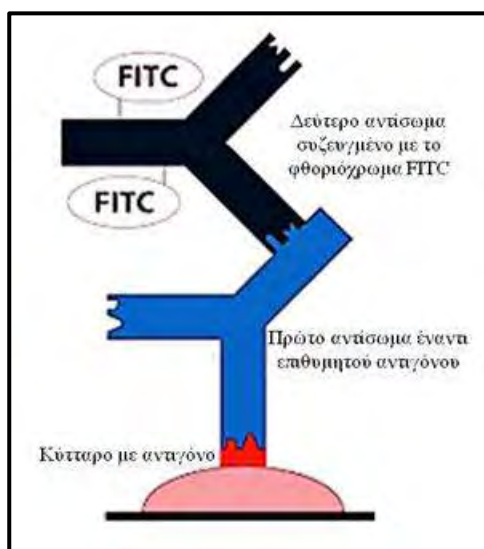
Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Huh7) και μαστού (MCF7) καλλιεργήθηκαν με πλήρες θρεπτικό μέσο (θρεπτικό υλικό DMEM, 10% FBS, 1000 U/l πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη), μέσα σε τρυβλία καλλιέργειας διαμέτρου 10 cm ή 60 mm. Επώαστηκαν σε κατάλληλο επωαστικό θάλαμο στους 37°C και σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂.

Τα κύτταρα επωάζονται και ανακαλλιεργούνται όταν το τρυβλίο κορεστεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%. Καθώς τα κύτταρα Huh7 και MCF7 διπλασιάζονται κάθε 24 και 38 ώρες αραιώθηκαν σε τέτοιο βαθμό ώστε να χρειάζονται ανακαλλιέργεια κάθε 48 ώρες. Αρχικά αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο από το κορεσμένο τρυβλίο όπου τα κύτταρα ήταν προσκολλημένα. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με αποστειρωμένο διάλυμα

φωσφορικών αλάτων PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,46 mM KH₂PO₄). Για την αποκόλλησή τους, έγινε επίδραση με το ένζυμο τρυψίνη (1 ml τρυψίνη-EDTA 1x σε PBS) για 3-5 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκε θρεπτικό μέσο, ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη αραίωση, και έγινε επαναιώρηση των κυττάρων. Από το αιώρημα μεταφέρθηκαν ορισμένα ml κυττάρων σε νέα τρυβλία στα οποία έχουν προστεθεί 7 ml θρεπτικού μέσου (για τρυβλίο 10 cm) ή 3 ml (για τρυβλίο 60 mm). Η όλη κατεργασία των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες μέσα σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής.

3.2.12 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Η τεχνική αυτή καθιστά εφικτή την παρατήρηση πρωτεϊνών και τη μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού τους. Σε κύτταρα που έχουν μονιμοποιηθεί σε καλυπτρίδες και οι μεμβράνες τους έχουν γίνει διαπερατές, γίνεται επίδραση με αντίσωμα για την υπό μελέτη πρωτεΐνη-αντιγόνο. Στη συνέχεια γίνεται επίδραση με δευτερεύον αντίσωμα που αναγνωρίζει το πρώτο και φέρει συζευγμένες φθορίζουσες ομάδες. Ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος το οποίο προσπίπτει κάθετα στο επίπεδο των δειγμάτων. Η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού που φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.



Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση της αρχής της μεθόδου του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός της G3BP1 και του HIF-1α, ενώ στη συνέχεια διενεργήθηκε ποσοτική ανάλυση μέσω του λογισμικού ImageJ με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση της ήπιας υποξίας (1% O₂) στο σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες σε σχέση με την νορμοξία παρουσία του NaAsO₂. Τα κύτταρα αρχικά επώαστηκαν για 24 ώρες και προσκολλήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες. Στη συνέχεια, επώαστηκαν για 4 ή 24 ώρες σε υποξία (1% O₂) ή νορμοξία (21% O₂) στους 37°C. Έπειτα,

προστέθηκε στη καλλιέργεια NaAsO_2 σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM και για χρονικό διάστημα 30 λεπτών για να γίνει επαγωγή των κοκκιδίων του στρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα φορμαλδεΰδης 3,7% σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 8 λεπτών με PBS και έπειτα οι κυτταρικές μεμβράνες έγιναν διαπερατές με επίδραση 0,1% Triton X-100 σε PBS για 15 λεπτά στους 4°C. Επαναλήφθηκαν τρεις πλύσεις με PBS και στη συνέχεια έγινε κατεργασία με διάλυμα κορεσμού 1% BSA, 0,1% Tween 20 σε PBS για να καλυφθούν πιθανές θέσεις μη ειδικής αλληλεπίδρασης με το αντίσωμα. Στη συνέχεια έγινε επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα από ορό ποντικού έναντι της G3BP1 σε αραιώση 1:1000 ή/και έναντι του HIF-1α (από ορό κουνελιού) σε αραιώση 1:1000, για 16 ώρες στους 4°C. Την επόμενη μέρα έγιναν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με PBS και ακολούθησε επώαση με αντίσωμα έναντι του μονοκλωνικού αντισώματος από ορό ποντικού (αραιώση 1:500) ή/και έναντι του αντισώματος από ορό κουνελιού (αραιώση 1:250). Τα δεύτερα αντισώματα που αναγνωρίζουν ανοσοσφαιρίνες ποντικού ή κουνελιού φέρουν φθορίζουσες ομάδες Cy3 (εκπέμπει στα 564 nm) ή FITC (εκπέμπει στα 488 nm) αντίστοιχα. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών PBS. Έπειτα έγιναν πλύσεις των καλυπτρίδων με αποστειρωμένο H_2O . Εν συνεχεία οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα διατήρησης φθορισμού MOWIOL (Sigma) στο οποίο έχει προστεθεί η φθορίζουσα χρωστική ουσία DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) που δεσμεύεται στη χρωματίνη κι έτσι επιτυγχάνεται η «βαφή» του πυρήνα των κυττάρων. Οι καλυπτρίδες επώαστηκαν στο σκοτάδι για 60 λεπτά για να στερεωθούν στις αντικειμενοφόρους πλάκες και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Πιθανή φύλαξη των αντικειμενοφόρων με τις προσκολλημένες καλυπτρίδες πραγματοποιείται στους -20°C.

3.2.13 Ποσοτική ανάλυση σχηματισμού κοκκιδίων του στρες

Η παρούσα ανάλυση αφορούσε στον αριθμό των κοκκιδίων του στρες ανά κύτταρο, στην επιφάνεια ανά κοκκίδιο του στρες και στο κλάσμα της κυτταρικής επιφάνειας που καταλαμβάνουν όλα τα κοκκίδια του στρες ανά κύτταρο προς τη συνολική επιφάνεια του κυττάρου. Για τη διεκπεραίωση της *in silico* αυτής διαδικασίας, αρχικά ελήφθησαν αρκετά οπτικά πεδία ανοσοφθορισμού της G3BP1 υπό μορφή 5 οπτικών τομών (slices) σε συγκεκριμένες αποστάσεις, ούτως ώστε να ανιχνεύονται όλα τα κοκκίδια του στρες και για να μπορεί να γίνει ακριβής ποσοτικοποίηση επιλέχθηκαν δέκα (10) ευδιάκριτα οπτικά πεδία για ποσοτική ανάλυση. Ακολούθως, μέσω του λογισμικού ImageJ εφαρμόστηκε μια σειρά εντολών ως εξής: αρχικά επιλέγεται το επιθυμητό οπτικό πεδίο και οι πακεταρισμένες σε οπτικές τομές εικόνες του εν λόγω οπτικού πεδίου στοιβάζονται και συγχωνεύονται σε μία εικόνα μέγιστης έντασης. Ακολούθως επιλέγεται η εντολή «Process→Smooth» με σκοπό την κανονικοποίηση

της έντασης του κάθε pixel σε σχέση με τα περιβάλλοντα pixel, βοηθώντας στη διάκριση των αληθινών εστιών (κοκκίδια του στρες), από πιθανώς ψευδώς θετικά σήματα που ελήφθησαν με την κάμερα του μικροσκοπίου φθορισμού. Έπειτα, επιλέγεται η εντολή «Process→Math→Subtract» για την απομάκρυνση του «θορύβου». Αυτό αποτελεί στάδιο κλειδί στην όλη διαδικασία καθώς ξεχωρίζει εστίες που έχουν νόημα, από «θόρυβο» που προκαλείται από το μικροσκόπιο και τον διάχυτο φθορισμό. Ύστερα, μέσω της τύπου «plugin» εφαρμογής του ImageJ ονόματι «Otsu Thresholding» επιλέγεται μία ουδός (threshold) πάνω από την οποία οποιεσδήποτε κυτταροπλασματικές εστίες έντονου σήματος θεωρούνται πραγματικές, δηλαδή κοκκίδια του στρες. Τέλος μέσω της επιλογής «Analyze→Analyze measurements» εξάγονται τα αποτελέσματα σε αρχείο τύπου excel όπου για το εν λόγω οπτικό πεδίο αναγράφεται ο αριθμός των εστιών (foci) και η επιφάνεια που καταλαμβάνει η κάθε εστία στο συγκεκριμένο κύτταρο σε τετραγωνικά μικρόμετρα (μm^2).

3.2.14 Ψύξη κυττάρων θηλαστικών

Για την καλύτερη βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν σημαντικό τα κύτταρα και όταν το τρυβλίο καλλιέργειας στο οποίο αναπτύσσονταν είχε κορεστεί κατά ένα ποσοστό της τάξης του 70-80% (subconfluent). Ακολουθήθηκε, η διαδικασία κατεργασίας των κυττάρων με τρυψίνη που περιγράφηκε στην υποενότητα «Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών» και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση των κυττάρων στο καλλιεργητικό υλικό σε συνθήκες 1000 g για 5 λεπτά στους 20°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε μέσο κατάψυξης (freezing medium) το οποίο αποτελείται από FBS και 10% v/v (όγκο κατ'όγκον) DMSO. Στη συνέχεια το κυτταρικό εναιώρημα μοιράστηκε σε cryovials χωρητικότητας 1 ml. Τα cryovials τοποθετήθηκαν στους -20 °C για ολονύκτια συντήρηση και την επόμενη ημέρα τοποθετήθηκαν στους -80 °C ή στο υγρό N₂ για μακροχρόνια συντήρηση.

3.2.15 Απόψυξη κυττάρων θηλαστικών

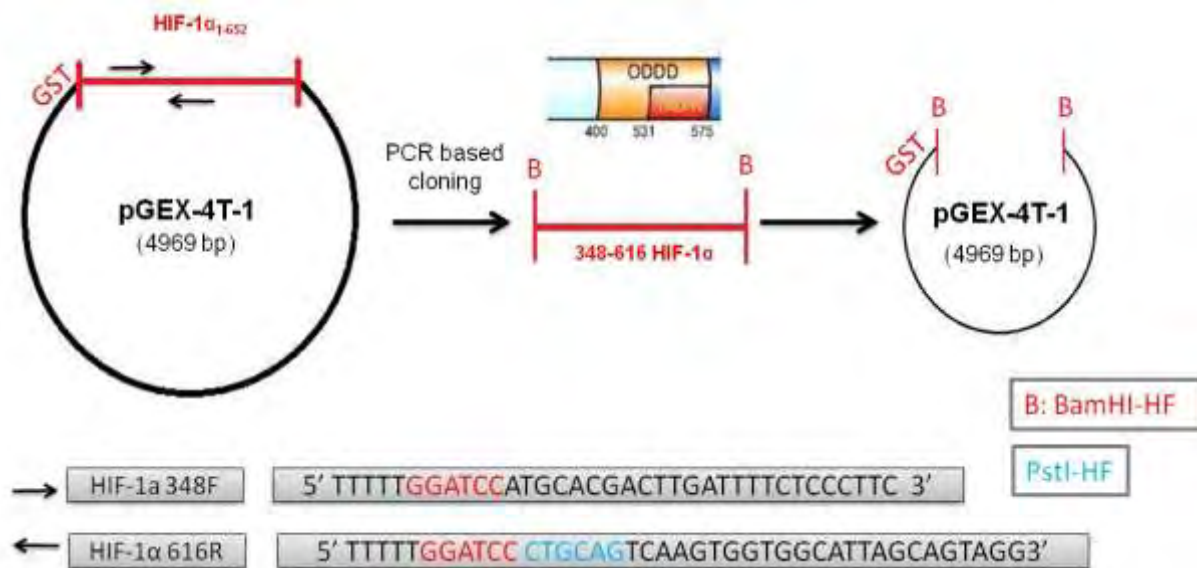
Η διαδικασία της απόψυξης των κυττάρων πρέπει να πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, με σχετικά γρήγορους πειραματικούς χειρισμούς για να ελαχιστοποιηθεί στο μέγιστο δυνατό επίπεδο ο κυτταρικός θάνατος. Αρχικά τα παγωμένα κύτταρα που διατηρούνται είτε σε δεξαμενή υγρού N₂, είτε στους -80 °C μεταφέρονται σε υδατόλουτρο στους 37 °C όπου και αποψύχονται με συνεχή ανακίνηση του σωληναρίου με γρήγορες κινήσεις ή εναλλακτικά γίνεται απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι τύπου Falcon χωρητικότητας 15 ml και προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε 1000 g, για 5 min στους 20°C. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό με σταδιακή και ομοιόμορφη εναιώρηση των κυττάρων στο σωληνάριο. Έγινε μηχανική ανάδευση με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας με σκοπό την διάσπαση των κυτταρικών

συσσωματωμάτων και την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων. Ακολούθως τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας διαμέτρου 10 cm ή 60 mm. Έπειτα τοποθετούνται σε κατάλληλο επωαστικό θάλαμο στους 37°C και σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

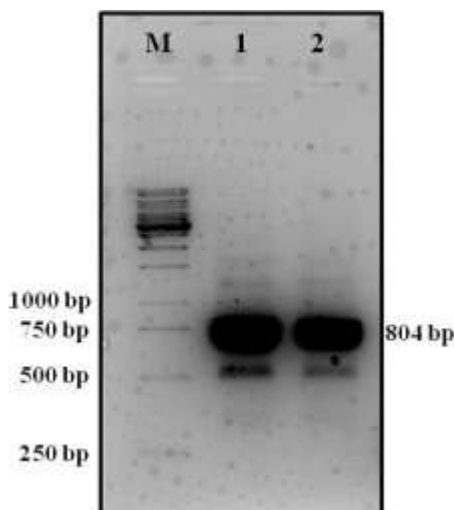
4.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ HIF-1α

4.1.1 Κλωνοποίηση του τμήματος cDNA που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία 348-616 του HIF-1α.



Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση της κλωνοποίησης του τμήματος που αντιστοιχεί στην αμινοξική περιοχή 348-616 του HIF-1α

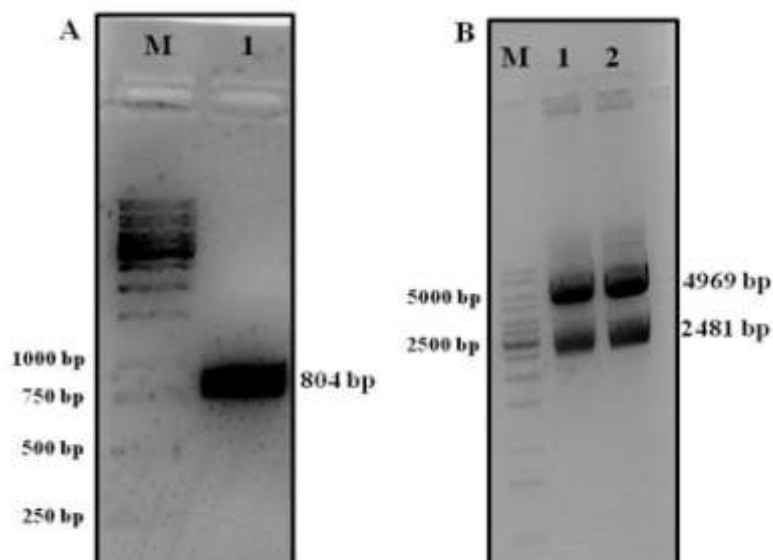
Αρχικά πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με σκοπό την ενίσχυση και τον πολλαπλασιασμό του cDNA της περιοχής 348-616 του HIF-1α ή HIF-1α (348-616), όπως αναγράφεται αναλυτικά στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι».



Εικόνα 21: Ενίσχυση της αλληλουχίας cDNA του HIF-1α (348-616) με PCR. Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της PCR σε 1% w/v πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

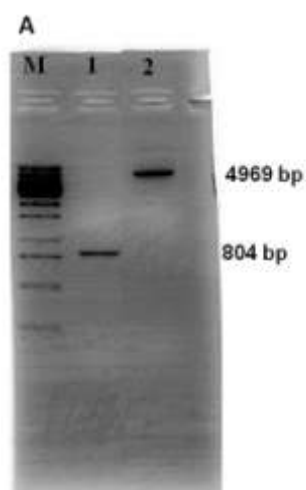
M: μάρτυρες μοριακού βάρους 1,2: προϊόν της PCR (η αντίδραση 50 μ l μοιράστηκε σε δύο διαδρομές)

Η ενίσχυση του τμήματος cDNA του HIF-1 α (348-616), πιστοποιήθηκε μετά από ηλεκτροφορητική ανάλυση η οποία έδειξε μια κύρια ζώνη στο αναμενόμενο μέγεθος των 804 bp (Εικόνα 21). Ακολούθως, το εν λόγω τμήμα cDNA του HIF-1 α απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης (απόδοση DNA: 951 ng) και τόσο το ίδιο όσο και το πλασμίδιο pGEX-4T1-HIF-1 α υποβλήθηκαν σε πέψη με BamHI (Εικόνα 22 A, B).



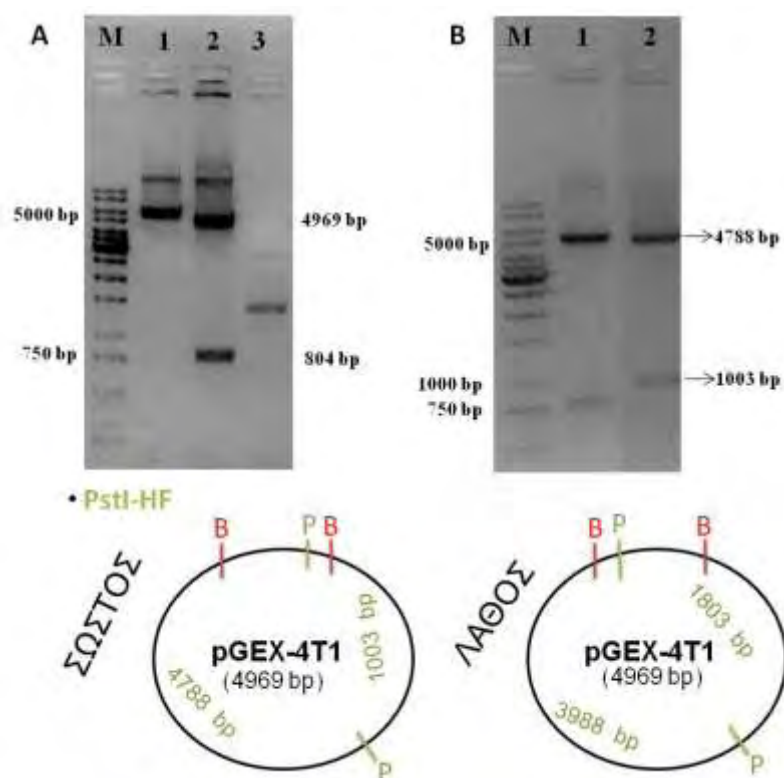
Εικόνα 22: Παρασκευαστική πέψη cDNA του HIF-1 α (348-616) και του πλασμιδίου pGEX-4T1-HIF-1 α με BamHI. Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της πέψης του cDNA (A) και του πλασμιδίου (B) σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5% w/v), M: μάρτυρες μοριακού βάρους.

Τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 23) και τόσο το τμήμα cDNA του HIF-1 α (348-616) (804 bp) όσο και το τμήμα του πλασμιδίου που αντιστοιχεί στον φορέα pGEX-4T1 (4969 bp) απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και αναλύθηκαν πάλι με ηλεκτροφόρηση για να διαπιστωθεί η καθαρότητά τους και να γίνει συγκριτική ποσοτικοποίηση τους με βάση τους μάρτυρες μοριακού βάρους (Εικόνα 23)



Εικόνα 23: Ηλεκτροφορητική ανάλυση του cDNA του HIF-1α (348-616) (1) και του πλασμιδιακού φορέα pGEX-4T1 (2) που έχουν υποστεί πέψη με BamHI μετά την απομόνωση τους από πηκτή. M: μάρτυρες μοριακού βάρους.

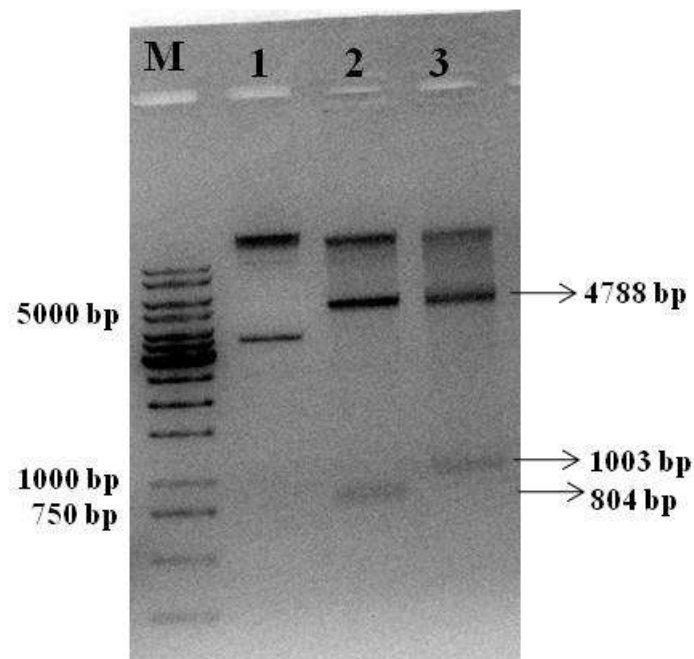
Ακολούθως, τα δύο DNA αναμίχθηκαν με μοριακή αναλογία φορέα:ενθέματος 1:3 και υποβλήθηκαν σε αντίδραση λιγάσης. Με το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης μετασχηματίστηκαν βακτηριακά κύτταρα E.Coli TOP10 τα οποία επιστρώθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας παρουσία αμπικιλίνης και επωάστηκαν σε 37 °C για 16 ώρες. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για ενοφθαλμισμό υγρών καλλιεργειών που επωάστηκαν στους 37 °C για 16 ώρες. Από τις υγρές καλλιέργειες απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA και οι διαφορετικοί κλώνοι ελέγχθηκαν μέσω δοκιμαστικών πέψεων με το περιοριστικό ένζυμο BamHI για έλεγχο εισαγωγής του ενθέματος cDNA του HIF-1α (348-616), στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1. Οι θετικοί για τη παρουσία του ενθέματος κλώνοι ελέγχθηκαν μέσω πέψης με το περιοριστικό ένζυμο PstI για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού του ενθέματος.



Εικόνα 24: Έλεγχος εισαγωγής του ενθέματος cDNA του HIF-1α (348-616) στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1. Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων πέψης διαφορετικών κλώνων πλασμιδιακού DNA με BamHI (A) και PstI (B). M: μάρτυρες μοριακού βάρους, 1,2,3: Πλασμίδια διαφορετικών αποικιών. Γ) Χάρτες θέσεων ενζύμων περιορισμού του κλωνοποιημένου cDNA του HIF-1α (348-616) στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24 από τις 3 βακτηριακές αποικίες από τις οποίες έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA, μόνο σε μία ανιχνεύθηκε πλασμίδιο που περιείχε το cDNA του HIF-1α (348-616) ως DNA μεγέθους 804 bp και τον pGEX-4T1 με μέγεθος 4969 bp. Το cDNA σε αυτό τον κλώνο είχε το σωστό προσανατολισμό καθώς με πέψη με PstI προέκυψαν τμήματα μεγέθους 4788 και 1003 bp που αντιστοιχούν σύμφωνα με την Εικόνα 24Γ στον σωστό προσανατολισμό του ενθέματος.

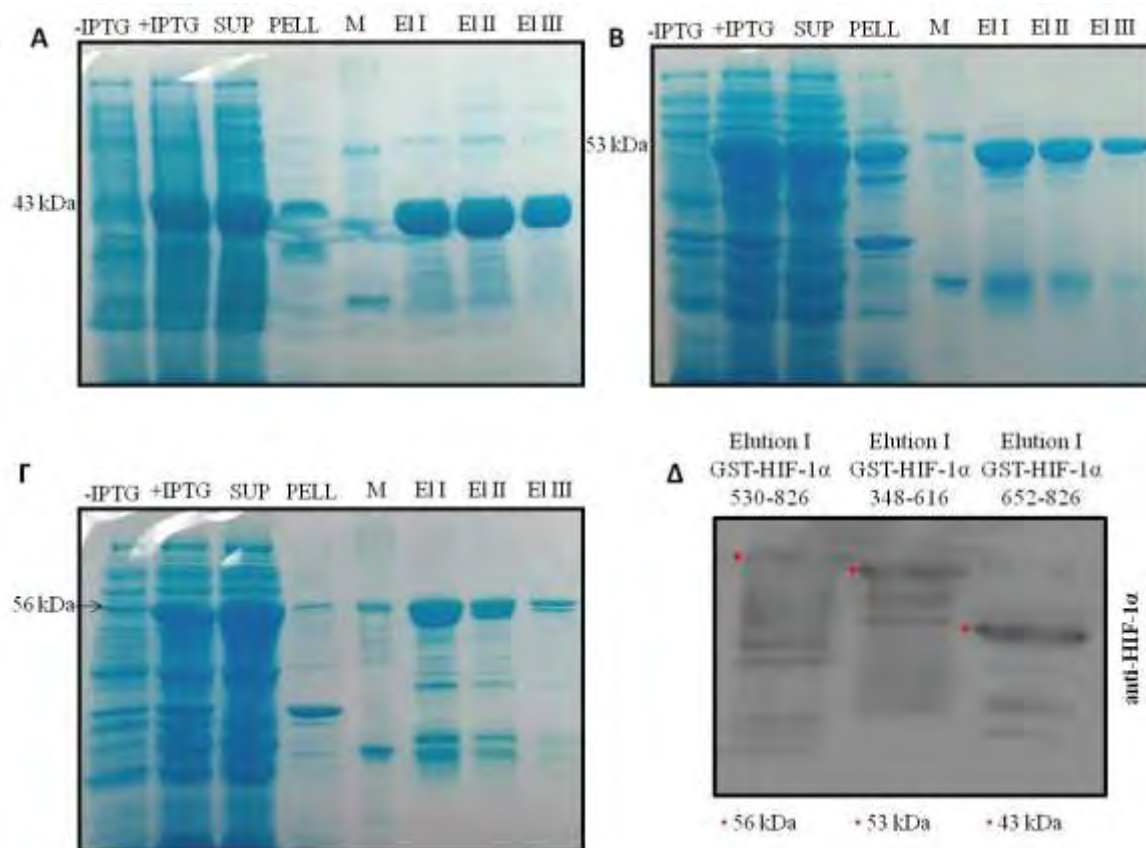
Τέλος, από την υγρή καλλιέργεια της θετικής βακτηριακής αποικίας πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με χρήση στήλης και το πλασμίδιο που απομονώθηκε ελέγχθηκε πάλι για την εισαγωγή του ενθέματος και τον προσανατολισμό του με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και PstI, αντίστοιχα (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Επιβεβαίωση της κατασκευής του πλασμιδίου *pGEX-4T1-HIF-1α (348-616)*. *M*: μάρτυρες μοριακού βάρους, *1*: άκοπο πλασμίδιο, *2*: προϊόντα πέψης με *Bam*HI, *3*: προϊόντα πέψης με *Pst*I.

4.1.2 Υπερέκφραση και καθαρισμός των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων GST-HIF-1α(348-616), GST-HIF-1α(530-826) και GST-HIF-1α(652-826).

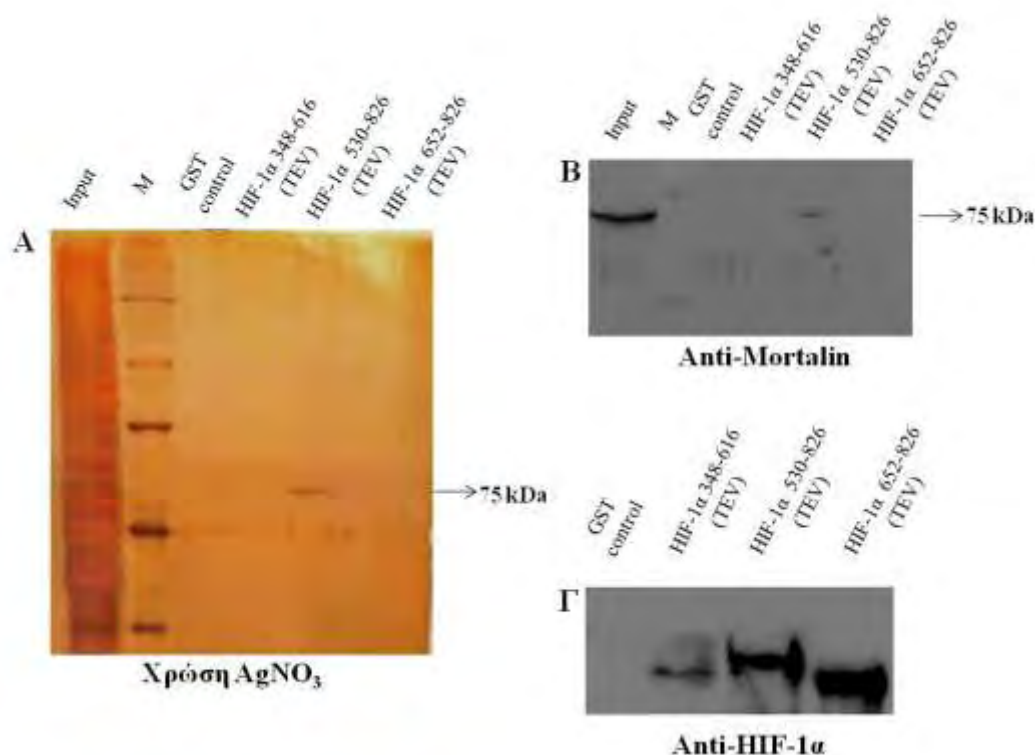
Τα πλασμίδια *pGEX-4T1HIF-1α 348-616*, *pGEX-4T1HIF-1α 530-826* και *pGEX-4T1HIF-1α 652-826* εισήχθησαν με μετασχηματισμό σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli BL21RIL*, προκειμένου να γίνει επαγωγή της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνικών τμημάτων του HIF-1α εκφράζονται σε σύντηξη με τον επίτοπο GST. Καλλιέργειες των μετασχηματισμένων βακτηρίων επώασθηκαν μέχρι να φτάσουν σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης (OD: 0,4-0,6) και έγινε επαγωγή με τη προσθήκη IPTG. Κρατήθηκαν δείγματα καλλιέργειας πριν την προσθήκη του IPTG (-IPTG) και μετά το πέρας της επώασης με IPTG (+IPTG). Ακολούθως τα κύτταρα συλλέχθηκαν, λύθηκαν και τα εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση σε διαλυτό (sup) και σε αδιάλυτο κλάσμα (pellet), από τα οποία κρατήθηκαν δείγματα. Το διαλυτο κλάσμα στη συνέχεια επώασθηκε με εξισσοροπημένα σφαιρίδια GSH-Sepharose και έπειτα πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές εκλούσεις των δεσμευμένων σε αυτά χημικών πεπτιδίων, με γλουταθειόνη. Από τις εκλούσεις κρατήθηκαν επίσης δείγματα. Τα δείγματα από όλα τα στάδια της διαδικασίας ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE), χρώση με Coomassie και ανοσοαποτύπωση (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Ανάλυση δειγμάτων των καλλιιεργειών (-/+ IPTG), των κλασμάτων φυγοκέντρωσης (sup/pellet) και των κλασμάτων έκλουσης από GSH-Sepharose (Elution I, II, III) των GST-HIF1α 652-826(**A**), GST-HIF1α 348-616(**B**) και GST-HIF1α 530-826 (**Γ**) με SDS-PAGE. (**Δ**): Ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης από GSH-Sepharose (Elution I) με ανοσοαποτύπωση και αντισώμα έναντι του HIF-1α.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 26, τα τρία χμαιορικά πεπτίδια του HIF-1α (σε σύντηξη με GST) υπερεκφράστηκαν παρουσία IPTG και το μεγαλύτερο μέρος της ποσότητας του καθενός εμφανίστηκε στο διαλυτό κλάσμα (sup). Ο καθαρισμός για το κάθε πεπτίδιο μέσω χρωματογραφίας αγκιστείας σε σφαιρίδια GSH-Sepharose ήταν ικανοποιητικός. Το πολυπεπτίδιο GST-HIF1α 652-826 εμφανίστηκε ως ζώνη των 43 kDa, το GST-HIF1α 530-826 στα 56 kDa και το GST-HIF1α 348-616 στα 53 kDa που αποτελούν και τα αναμενόμενα μεγέθη τους και η ταυτότητα τους επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση με χρήση αντισώματος έναντι του HIF-1α.

4.1.3 Συγκατακρήμιση (in vitro pull down assays) πρωτεϊνών κυττάρων Huh7 με τις χημεικές πρωτεΐνες GST-HIF-1α 530-826, GST-HIF-1α 652-826 και GST-HIF-1α 348-616.



Εικόνα 27: Ανίχνευση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τα ανασυνδυασμένα GST-HIF-1α πεπτίδια. Ολικά εκχυλισματα κυττάρων Huh7 υποβλήθηκαν σε συγκατακρήμιση με τα ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια GSH-Sepharose ανασυνδυασμένα GST-HIF-1α πεπτίδια. Τα εκλούσματα των σφαιριδίων αναλύθηκαν με: ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και χρώση με AgNO_3 (A) και ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της μορταλίνης (B) και αντίσωμα έναντι του HIF-1α (Γ).

Για να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την καρβοξυτελική επικράτεια του HIF-1α και τον βοηθούν στην αντι-αποπτωτική μιτοχονδριακή του λειτουργία, εξισορροπημένα σφαιρίδια GSH-Sepharose επώαστηκαν με 10 μg απομονωμένου τμήματος GST-HIF-1α 348-616 ή -530-826 ή -652-826 για μία ώρα υπό ανάδευση στους 4 °C. Ακολούθως, κύτταρα Huh7 λύθηκαν με κατάλληλο διάλυμα λύσης και επώαστηκαν σε πάγο για 15 λεπτά. Έγινε φυγοκέντρηση για την παραλαβή του κυτταρολύματος, και επακόλουθη επώαση αυτού (150 μg) με τα σφαιρίδια για 16 ώρες υπό ανάδευση στους 4 °C. Την επόμενη ημέρα, έγινε φυγοκέντρηση, εκπλύσεις των σφαιριδίων και εξισορρόπηση αυτών σε TEV buffer. Τέλος, έγινε επώαση με 1 μg της πρωτεάσης TEV για 16 ώρες στους 4 °C. Την επόμενη ημέρα έγινε φυγοκέντρηση με σκοπό τη παραλαβή των εκλουσμάτων.

Τα πεπτίδια του HIF-1α μαζί με πιθανές δεσμευμένες σε αυτά πρωτεΐνες εκλούσθηκαν από τα σφαιρίδια μετά από αφαίρεση της GST μέσω πρωτεολυτικής πένησης με τη πρωτεάση TEV και

αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και χρώση με AgNO_3 . Όπως ήταν αναμενόμενο στα εκλούσματα ανακτήθηκαν τα πολυπεπτίδια HIF-1α (348-616), HIF-1α (530-826) και HIF-1α (652-826) όπως επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του HIF-1α η οποία έδειξε τη παρουσία των αντίστοιχων ζωνών στα 29 kDa, 32 και 19 kDa, αντίστοιχα (Εικόνα 27Γ). Η βαφή με AgNO_3 έδειξε τη παρουσία μιας πρωτεϊνικής ζώνης στα 75kDa μόνο στο εκλούσμα του HIF-1α (530-826) (Εικόνα 27Α). Η ζώνη αυτή ταυτοποιήθηκε ως η μορταλίνη ή GRP75 μέσω ανοσοαποτύπωσης με ειδικό αντίσωμα (Εικόνα 27Β). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται, ότι η μορταλίνη αλληλεπιδρά με το HIF-1α (530-826), επιβεβαιώνοντας προηγούμενα αποτελέσματα που είχαν δείξει τη δέσμευση της με την αμινοξική περιοχή 616-658 του HIF-1α (Mylonis et al., 2017). Επιπλέον, η έλλειψη αλληλεπίδρασης της μορταλίνης με τα αμινοξικά τμήματα 348-616 και 652-826 του HIF-1α, υποδεικνύει πως η επικράτεια ETD 616-658 εκτός από επαρκής θέση για την αλληλεπίδραση με τη μορταλίνη, είναι και αναγκαία.

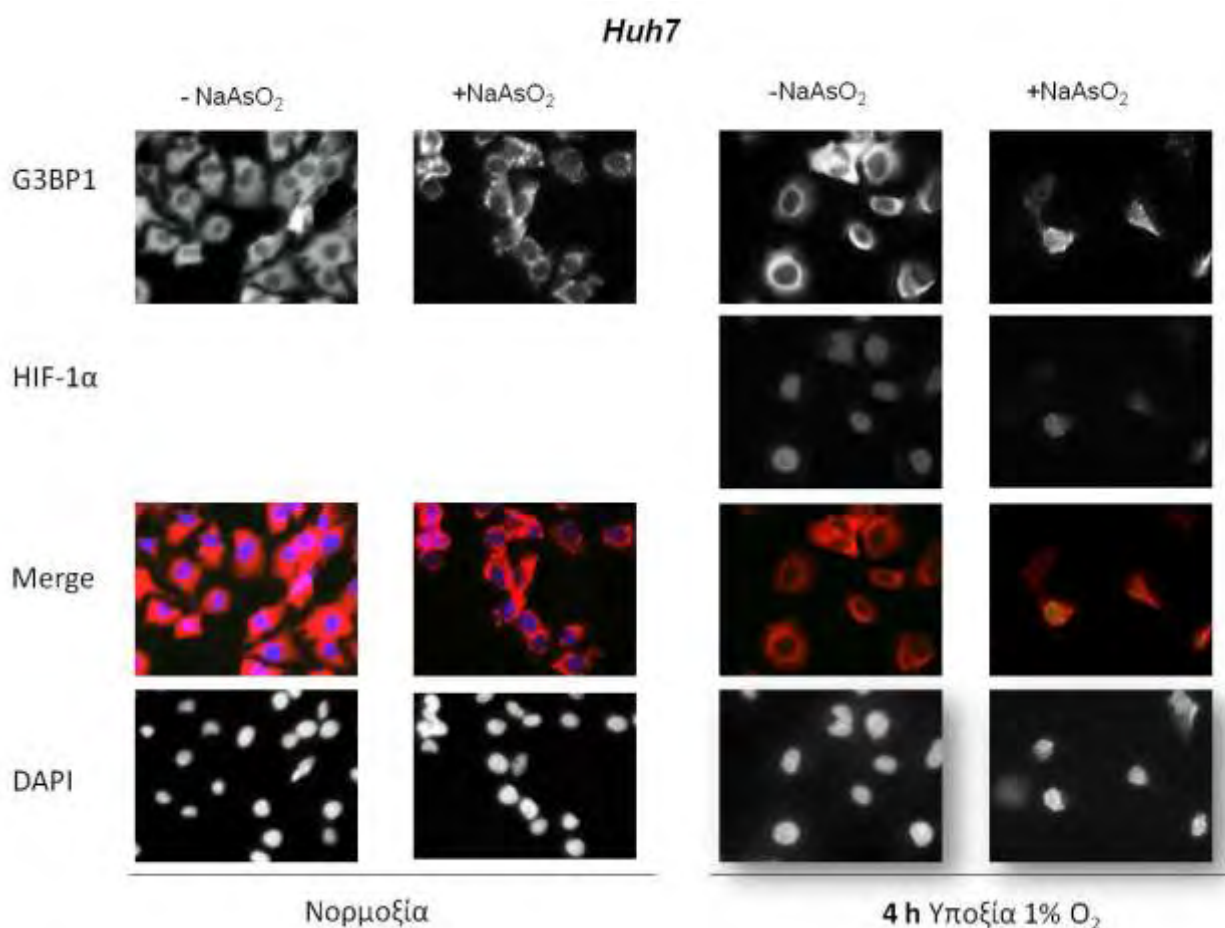
Τέλος, ανάλυση των εκλουσμάτων των HIF-1α (530-826) και HIF-1α (652-826) με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας μαζών (mass spectroscopy) είναι δυνατόν να οδηγήσει στη ταυτοποίηση νέων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την καρβοξυλική επικράτεια του HIF-1α και είναι πιθανόν να υποβοηθούν τη μιτοχονδριακή αντι-αποπτωτική του λειτουργία

4.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΚΑΙ ΤΟΥ HIF-1 ΜΕ ΤΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΟΚΚΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ

4.2.1 Ανάλυση με μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού του σχηματισμού κοκκιδίων του στρες.

Για να μελετηθεί η επίδραση της υποξίας (1% O_2) στο σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες που επάγονται από οξειδωτικό παράγοντα (NaAsO_2), πραγματοποιήθηκαν πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης G3BP1, η οποία αποτελεί συστατικό των κοκκιδίων του στρες, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές Huh7 και MCF7.

Καρκινικά κύτταρα Huh7 και MCF7 που καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες πάνω σε γυάλινες καλυπτρίδες, επώαστηκαν για 4 ή 24 ώρες σε υποξία ή νορμοξία (21% O_2) στους 37°C. Έπειτα, στα μισά δείγματα προστέθηκε NaAsO_2 στο μέσο καλλιέργειας σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM και η επώαση συνεχίστηκε για χρονικό διάστημα 30 λεπτών. Αμέσως μετά τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και υποβλήθηκαν σε ανάλυση μικροσκοπίας έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών G3BP1 και HIF-1α.

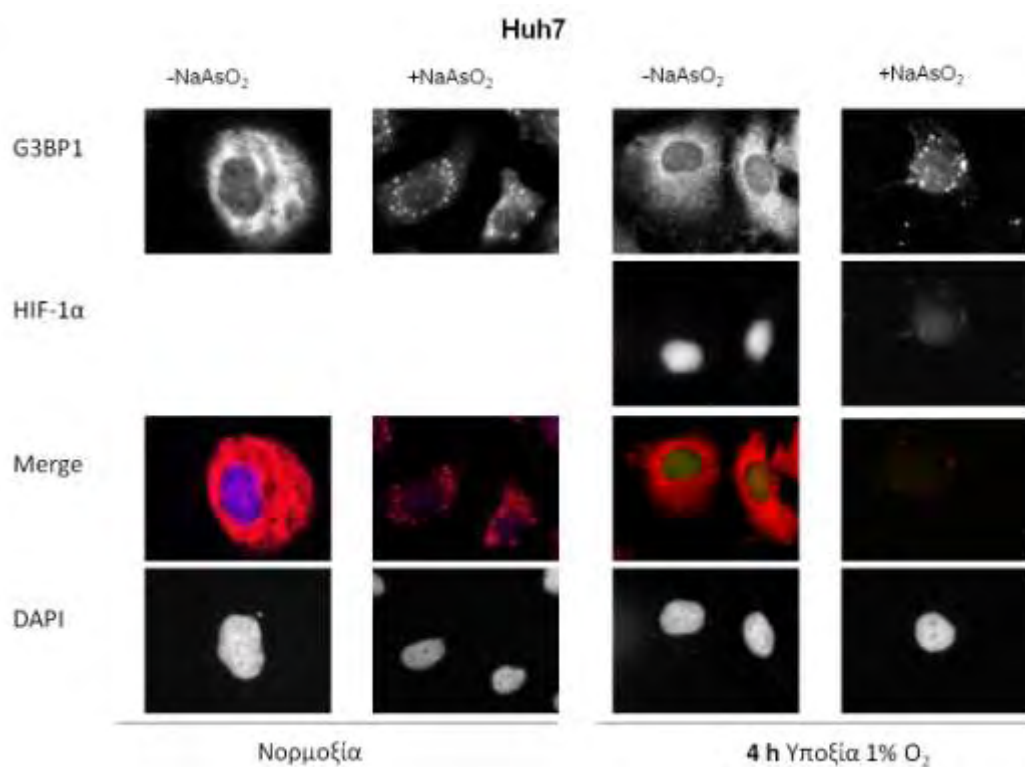


Εικόνα 28: Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού σε καρκινικά κύτταρα Huh7 που προεπώσθησαν σε νορμοξία ή για 4 ώρες σε υποξία πριν την προσθήκη ή μη NaAsO₂. Οι εικόνες δείχνουν την υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης-δείκτη των κοκκιδίων του στρες G3BP1, του HIF-1α και ελήφθησαν με αντικειμενικό φακό μεγέθυνσης 40x. Οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με DAPI.

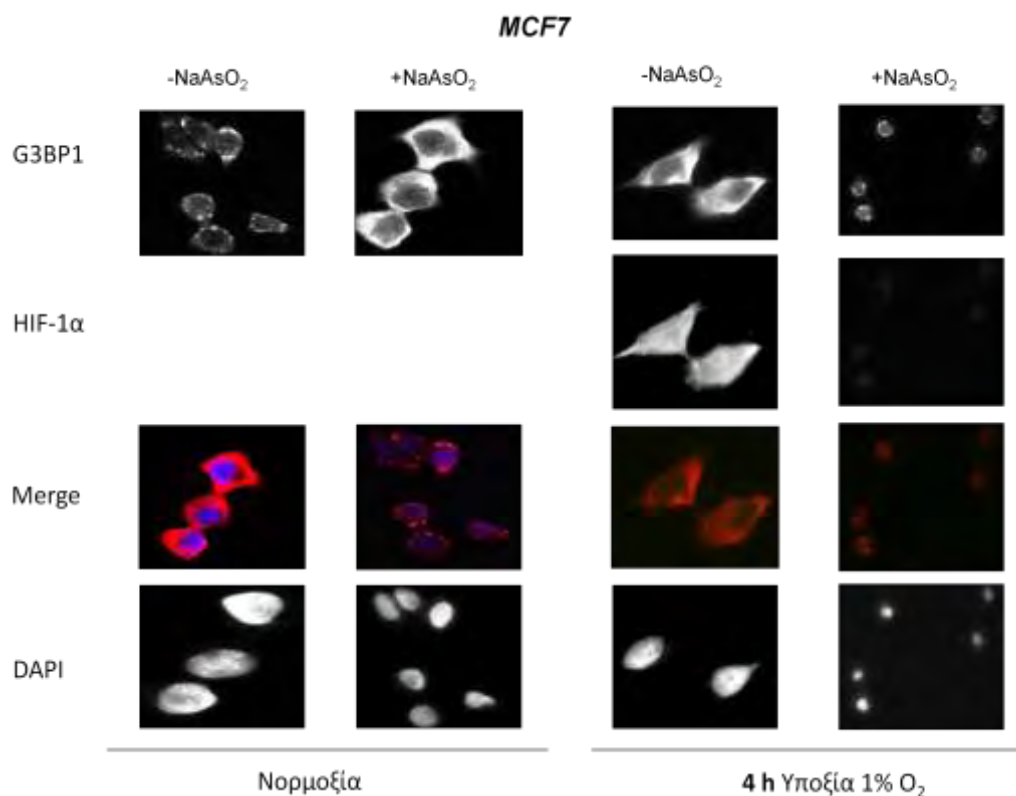
Όπως φαίνεται από τις εικόνες που ελήφθησαν με αντικειμενικό φακό μεγέθυνσης 40x (Εικόνα 28) ή μεγέθυνσης 100x (Εικόνα 29) η G3BP1 παρουσίασε διάχυτη κυτταροπλασματική κατανομή σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου (νορμοξία) και απουσία NaAsO₂ τόσο σε κύτταρα Huh7 (Εικόνες 28 & 29) όσο και σε κύτταρα MCF7 (Εικόνες 30 & 31). Αντίθετα, η προσθήκη NaAsO₂ προκάλεσε συνάθροιση της G3BP1 σε εστίες έντονου σήματος στο κυτταρόπλασμα υποδεικνύοντας το σχηματισμό κοκκιδίων του στρες και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Η προεπώαση των κυττάρων για 4 ώρες σε υποξία δεν προκάλεσε σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες απουσία NaAsO₂ καθώς η G3BP1 παρέμεινε διάχυτη στο κυτταρόπλασμα αν και έλαβε κυρίως περιπυρηνική κατανομή. Όπως και στη νορμοξία, η προσθήκη NaAsO₂ προκάλεσε την συσσώρευση της G3BP1 σε κοκκίδια του στρες και στα δύο είδη κυττάρων που είχαν προεπωασθεί για 4 ώρες σε υποξία (Εικόνες 28-31).

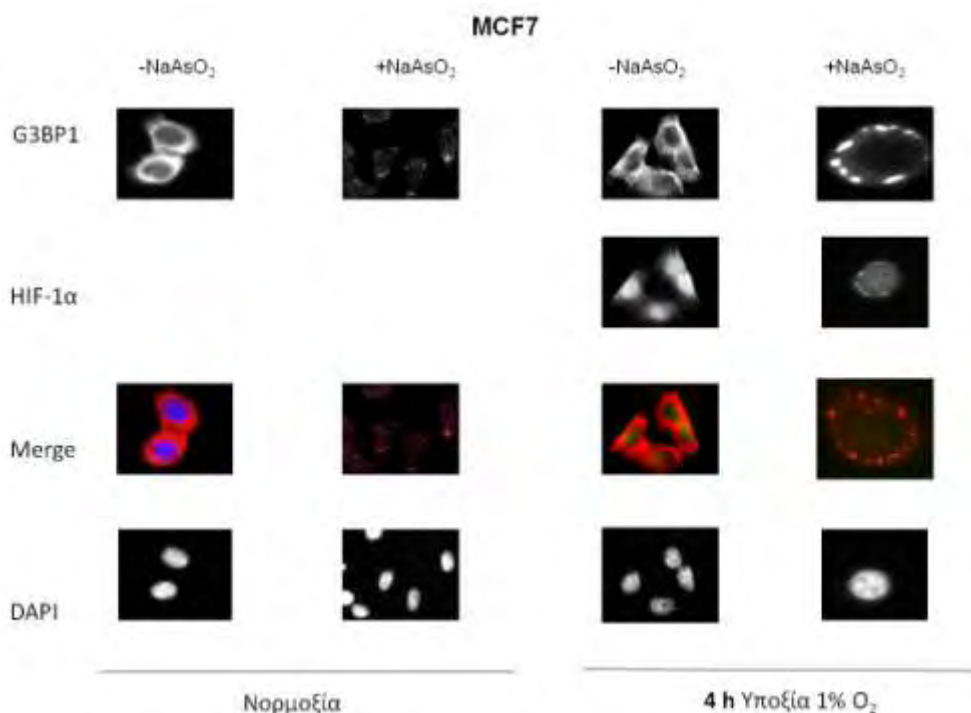
Η ενεργοποίηση της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία κάτω από τις συνθήκες του πειράματος επιβεβαιώθηκε από την επαγωγή του HIF-1α και τον εντοπισμό του στον πυρήνα τόσο σε κύτταρα Huh7 (Εικόνες 28 & 29) όσο και σε κύτταρα MCF7 (Εικόνες 30 & 31). Η προσθήκη NaAsO₂ δεν προκάλεσε ουσιαστική διαφορά στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-1α που παρέμεινε πυρηνικός σε όλες τις περιπτώσεις.



Εικόνα 29: Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού σε καρκινικά κύτταρα Huh7 που προεπώαστηκαν σε νορμοξία ή για 4 ώρες σε υποξία πριν την προσθήκη ή μη NaAsO₂. Οι εικόνες δείχνουν την υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης-δείκτη των κοκκιδίων του στρες G3BP1, του HIF-1α και ελήφθησαν με αντικειμενικό φακό μεγέθυνσης 100x. Οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με DAPI.



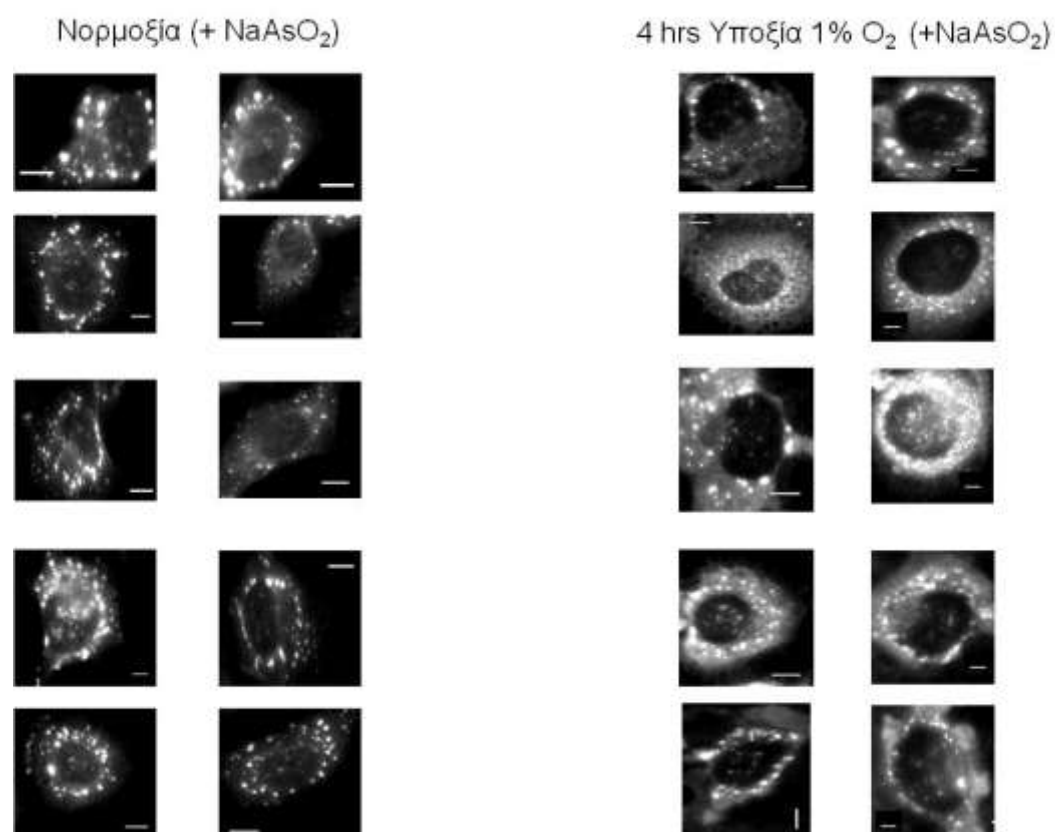
Εικόνα 30: Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού σε καρκινικά κύτταρα MCF7 που προεπώσθηκαν σε νορμοξία ή για 4 ώρες σε υποξία πριν την προσθήκη ή μη NaAsO₂. Οι εικόνες δείχνουν την υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης-δείκτη των κοκκιδίων του στρες G3BP1, του HIF-1α και ελήφθησαν με αντικειμενικό φακό μεγέθυνσης 40x. Οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με DAPI.



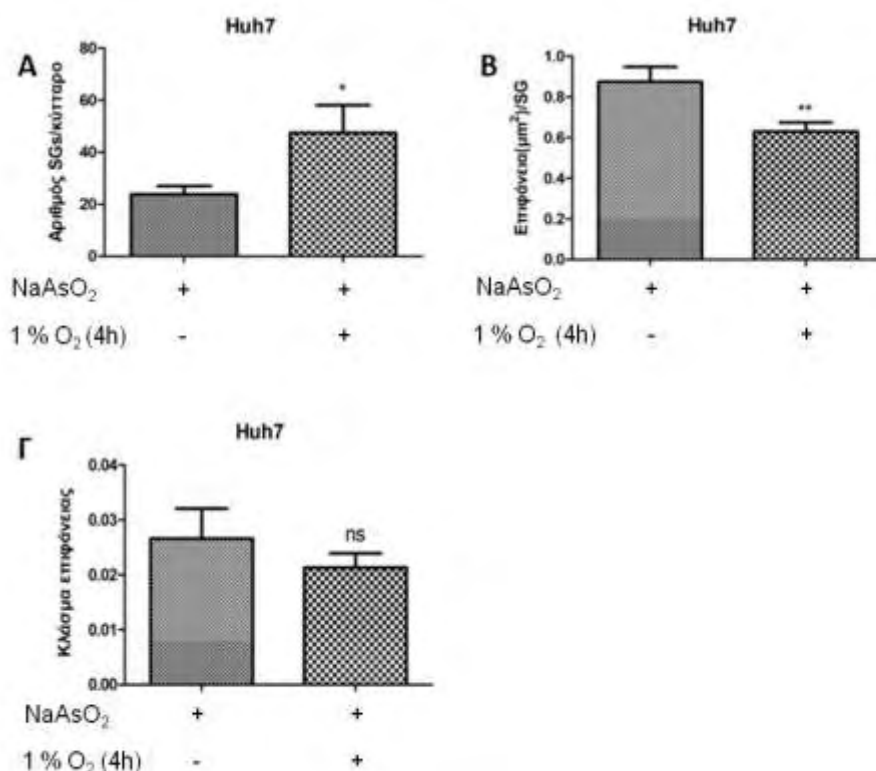
Εικόνα 31: Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού σε καρκινικά κύτταρα MCF7 που προεπωάστηκαν σε νορμοξία ή για 4 ώρες σε υποξία πριν την προσθήκη ή μη NaAsO₂. Οι εικόνες δείχνουν την υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης-δείκτη των κοκκιδίων του στρες G3BP1, του HIF-1α και ελήφθησαν με αντικειμενικό φακό μεγέθυνσης 100x. Οι πυρήνες έχουν χρωματισθεί με DAPI.

Για την εξαγωγή ποσοτικών συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση της υποξίας α) στον αριθμό των κοκκιδίων του στρες ανά κύτταρο, β) στο μέσο μέγεθος των κοκκιδίων του στρες και γ) στο μέσο κλάσμα της συνολικής επιφάνειας που καταλαμβάνουν τα κοκκίδια του στρες ενός κυττάρου προς τη συνολική επιφάνεια του ίδιου κυττάρου πραγματοποιήθηκε ανάλυση με το λογισμικό ImageJ. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν και αναλύθηκαν δέκα ευδιάκριτα οπτικά πεδία σε κύτταρα Huh7 και MCF7 που επωάστηκαν με NaAsO₂ σε συνθήκες νορμοξίας ή υποξίας (Εικόνες 32 & 34).

Huh7

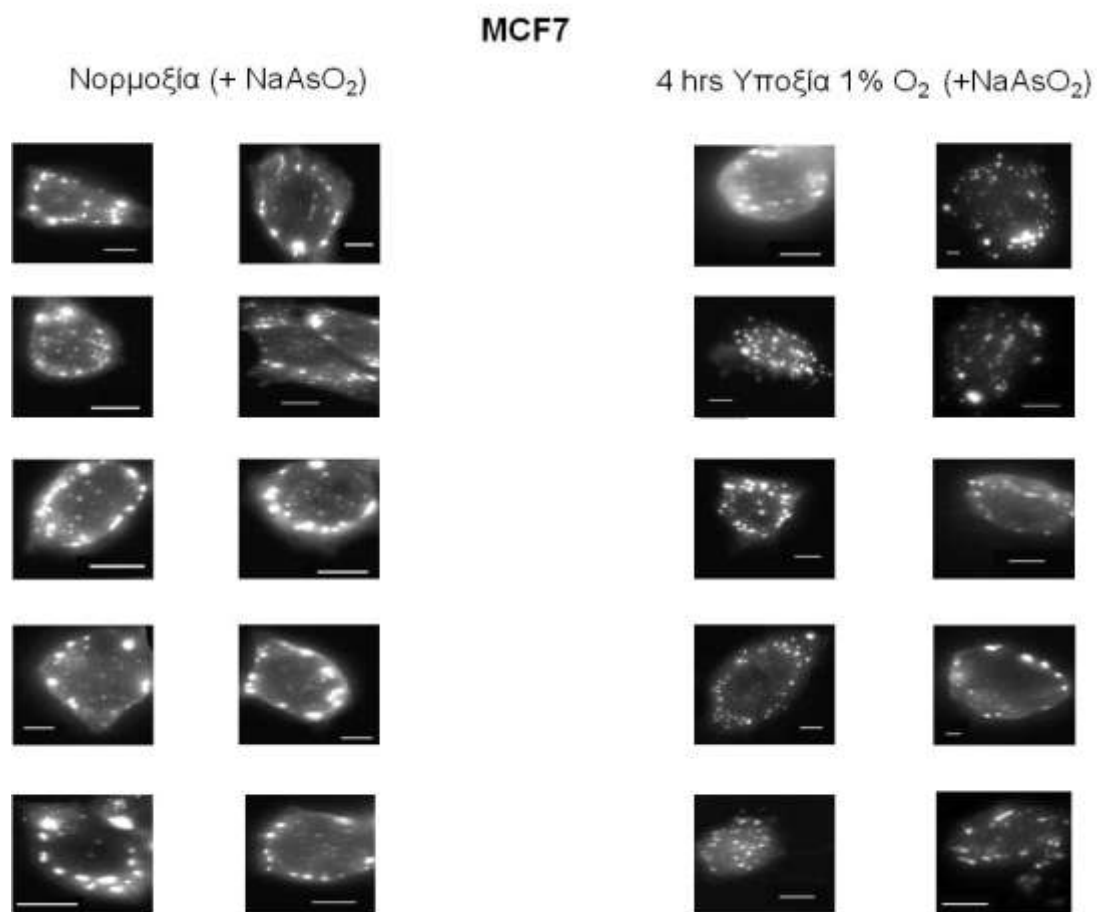


Εικόνα 32: Οπτικά πεδία ηπατικών καρκινικών κυττάρων Huh7 που επωάστηκαν με NaAsO₂ σε συνθήκες νορμοξίας ή 4 ωρών υποξίας. Κλίμακα εικόνων (scale bar): 10 μ m.

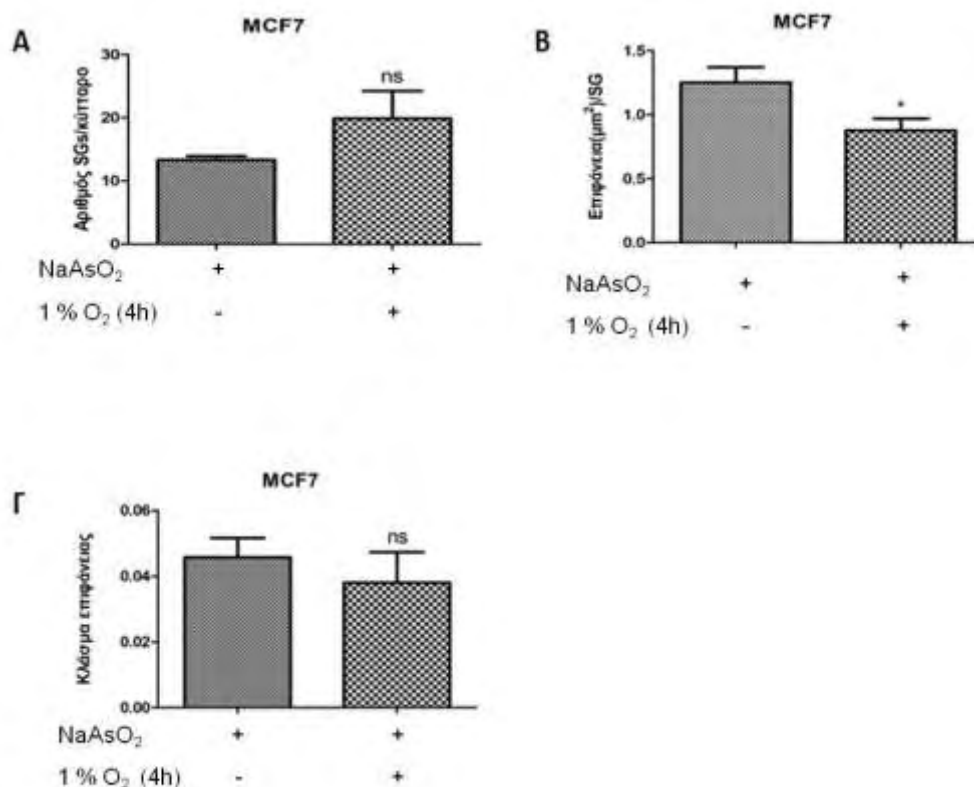


Εικόνα 33: Προσδιορισμός του μέσου αριθμού των κοκκιδίων του στρες ανά κύτταρο (**A**, Τιμή $P=0,0487$, $n=10$), της μέσης επιφάνειας (μm^2) ανά κοκκίδιο του στρες (**B**, $P=0,0032$, $n=238$ κοκκίδια για νορμοξία και $n=474$ για υποξία) και του μέσου κλάσματος της επιφάνειας που καταλαμβάνουν τα κοκκίδια του στρες σε ένα κύτταρο προς την επιφάνεια του ίδιου κυττάρου (**Γ**, Τιμή $P=0,3976$, $n=10$) σε καρκινικά κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν με $0,5 \text{ mM NaAsO}_2$ για 30 λεπτά μετά από προεπώαση σε νορμοξία ή υποξία 4 ωρών. Στα γραφήματα εμφανίζονται τα τυπικά σφάλματα.

Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 33*, ο μέσος αριθμός των κοκκιδίων του στρες ανά κύτταρο Huh7 αυξήθηκε από 23 κατά τη νορμοξία, σε περίπου 47 όταν είχε προηγηθεί τετράωρη υποξία. Αντίθετα, η μέση επιφάνεια ανά κοκκίδιο του στρες μειώθηκε από περίπου $0,8 \mu\text{m}^2$ στη νορμοξία σε $0,6 \mu\text{m}^2$ στην υποξία. Τέλος, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στο μέσο κλάσμα της συνολικής κυτταρικής επιφάνειας που καταλαμβάνουν όλα τα κοκκίδια του στρες σε ένα κύτταρο προς την επιφάνεια του ίδιου κυττάρου.



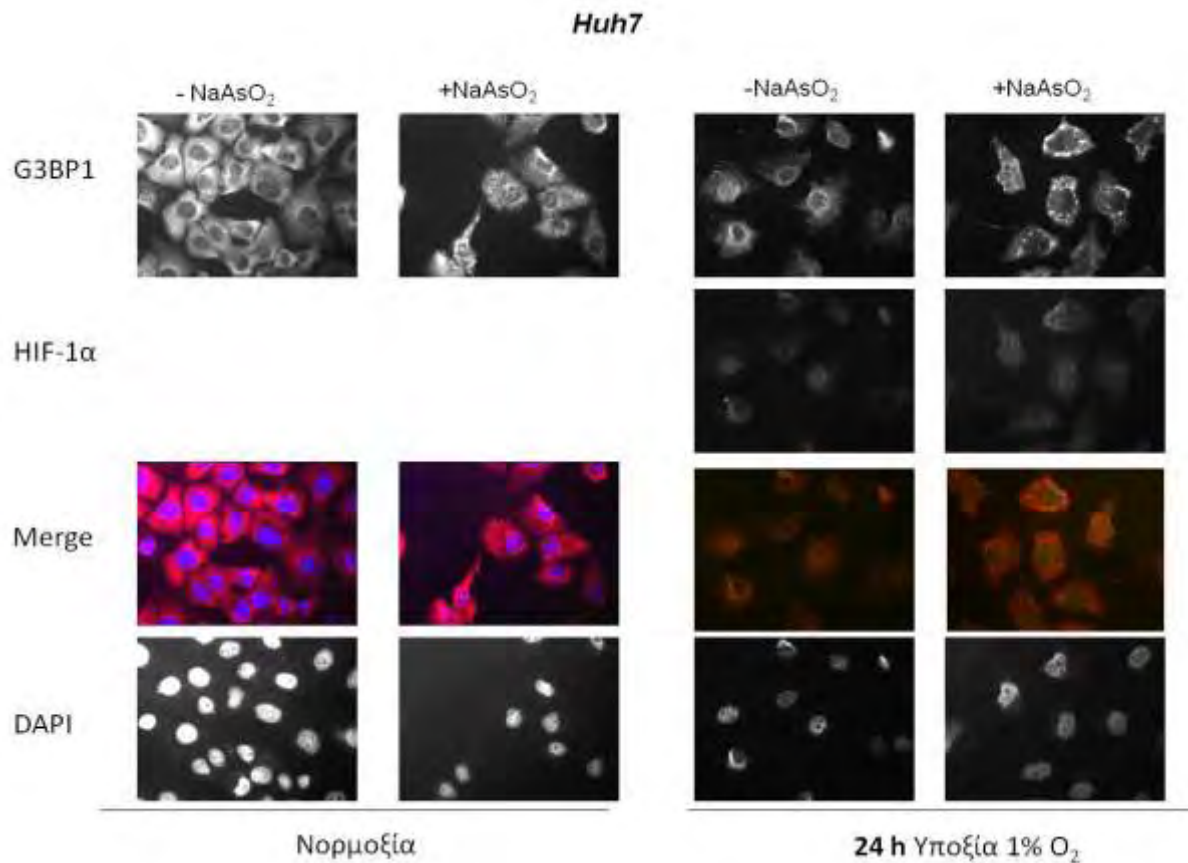
Εικόνα 34: Οπτικά πεδία κυττάρων μαστού MCF7 που επωάστηκαν με NaAsO₂ σε συνθήκες νορμοξίας ή 4 ωρών υποξίας. Κλίμακα εικόνων (scale bar): 10 μm.



Εικόνα 35: Προσδιορισμός του μέσου αριθμού των κοκκιδίων του στρες ανά κύτταρο (**A**, Τιμή $P=0,149$, $n=10$), της μέσης επιφάνειας (μm^2) ανά κοκκίδιο του στρες (**B**, $P=0,0123$, $n=133$ για νορμοξία και $n=199$ για υποξία) και του μέσου κλάσματος της επιφάνειας που καταλαμβάνουν τα κοκκίδια του στρες σε ένα κύτταρο προς την επιφάνεια του ίδιου κυττάρου (**Γ**, Τιμή $P=0,4965$, $n=10$) σε καρκινικά κύτταρα MCF7 που επωάστηκαν με $0,5 \text{ mM NaAsO}_2$ για 30 λεπτά μετά από προεπώαση σε νορμοξία ή υποξία 4 ωρών. Στα γραφήματα εμφανίζονται τα τυπικά σφάλματα.

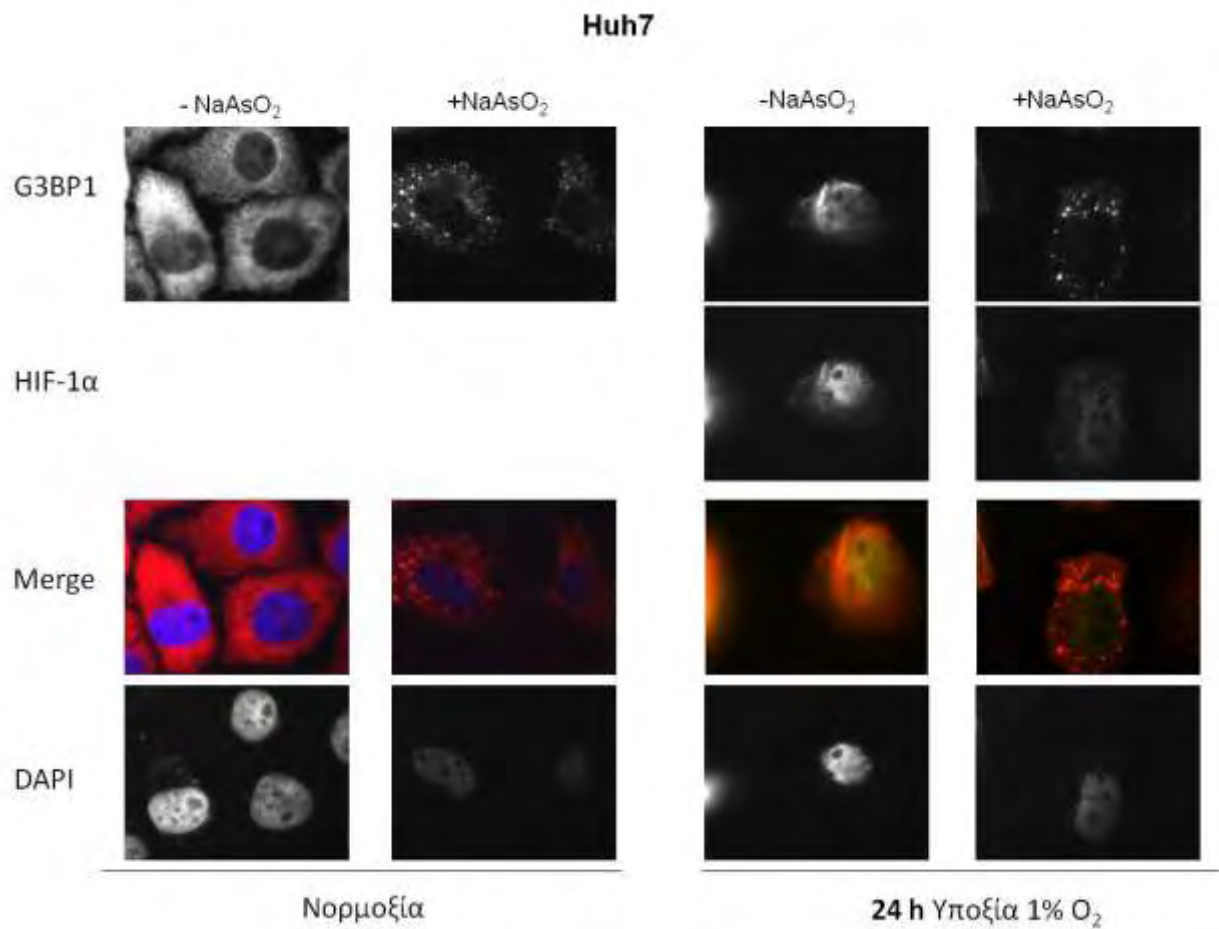
Ο μέσος αριθμός των κοκκιδίων του στρες ανά κύτταρο MCF7 παρουσίασε μία τάση για αύξηση σε συνθήκες υποξίας συγκριτικά με τη νορμοξία χωρίς ωστόσο αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, η μέση επιφάνεια ανά κοκκίδιο του στρες μειώθηκε από περίπου $1,2 \mu\text{m}^2$ στη νορμοξία σε $0,8 \mu\text{m}^2$ στην υποξία. Τέλος, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στο μέσο κλάσμα της συνολικής κυτταρικής επιφάνειας που καταλαμβάνουν όλα τα κοκκίδια του στρες σε ένα κύτταρο προς την επιφάνεια του ίδιου κυττάρου (Εικόνα 35).

Ανάλογα πειράματα με τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν και σε κύτταρα Huh7 που είχαν προεπωασθεί για 24 ώρες σε υποξία πριν την προσθήκη NaAsO_2 .

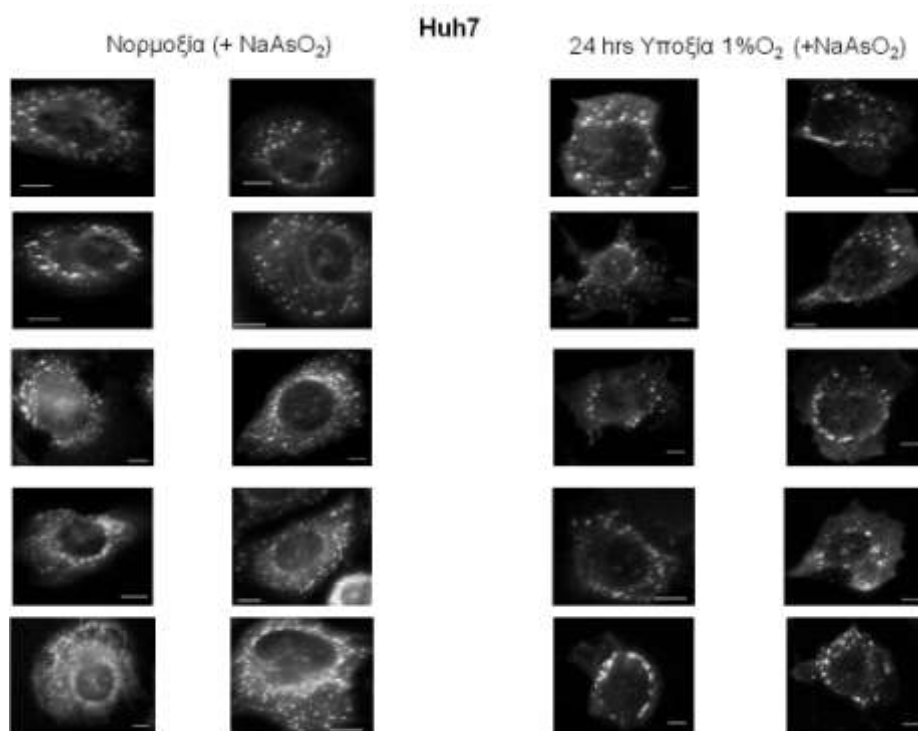


Εικόνα 36: Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού σε καρκινικά κύτταρα Huh7 που προεπώσθηκαν σε νορμοξία ή για 24 ώρες σε υποξία πριν την προσθήκη ή μη NaAsO₂. Οι εικόνες δείχνουν την υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης-δείκτη των κοκκιδίων του στρες G3BP1, του HIF-1α και ελήφθησαν με αντικειμενικό φακό μεγέθυνσης 40x. Οι πυρήνες έχουν σημειωθεί με DAPI.

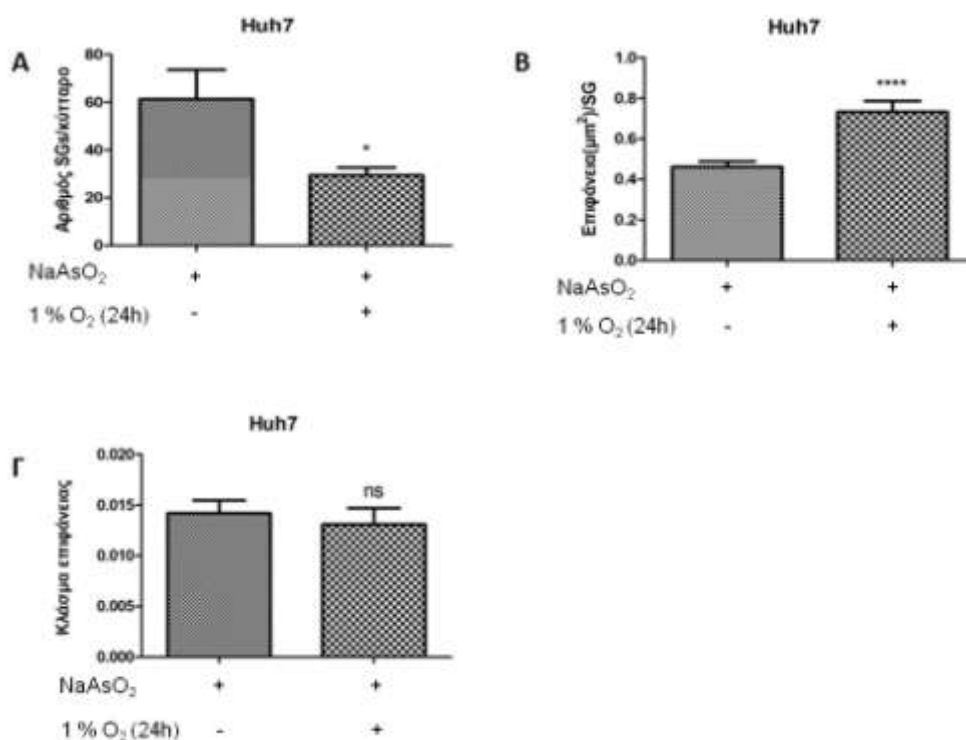
Όπως διαπιστώνεται από τις Εικόνες 36 & 37, τα ποιοτικά αποτελέσματα δεν διαφέρουν σημαντικά από αυτά των πειραμάτων που έγιναν σε ίδια κύτταρα μετά από τετράωρη προεπώαση σε υποξία.



Εικόνα 37: Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού σε καρκινικά κύτταρα *Huh7* που προεπώσθηκαν σε νορμοξία ή για 24 ώρες σε υποξία πριν την προσθήκη ή μη NaAsO₂. Οι εικόνες δείχνουν την υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης-δείκτη των κοκκιδίων του στρες G3BP1, του HIF-1α και ελήφθησαν με αντικειμενικό φακό μεγέθυνσης 100x. Οι πυρήνες έχουν σημανθεί με DAPI.



Εικόνα 38: Οπτικά πεδία ηπατικών καρκινικών κυττάρων Huh7 που επωάστηκαν με NaAsO_2 σε συνθήκες νορμοξίας ή 24 ωρών υποξίας. Κλίμακα εικόνων (scale bar): 10 μm .

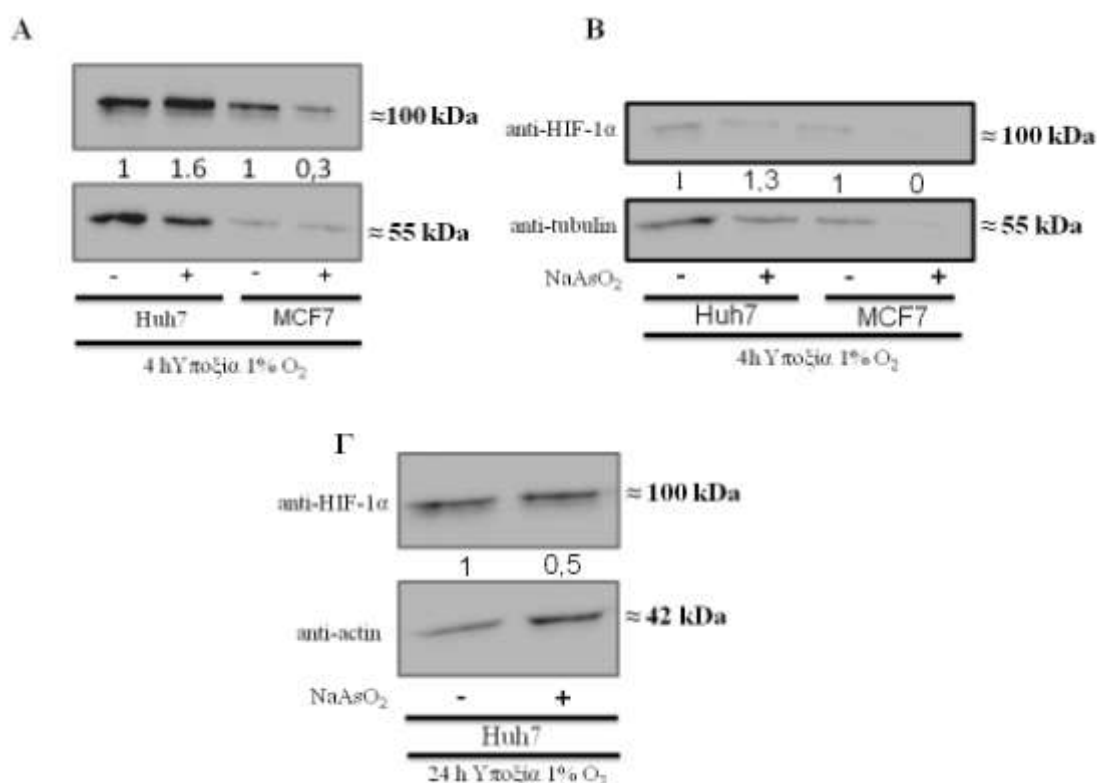


Εικόνα 39: Προσδιορισμός του μέσου αριθμού των κοκκιδίων του στρες ανά κύτταρο (**A**, Τιμή $P=0,021$, $n=10$), της μέσης επιφάνειας (μm^2) ανά κοκκίδιο του στρες (**B**, $P=0,0001$, $n=613$ κοκκίδια για νορμοξία και $n=294$ για υποξία) και του μέσου κλάσματος της επιφάνειας που καταλαμβάνουν τα κοκκίδια του στρες σε ένα κύτταρο προς την επιφάνεια του ίδιου κυττάρου (**Γ**, Τιμή $P=0,5975$, $n=10$) σε καρκινικά κύτταρα Huh7 που επωάστηκαν με 0,5 mM NaAsO_2 για 30 λεπτά μετά από προεπώαση σε νορμοξία ή υποξία 24 ωρών. Στα γραφήματα εμφανίζονται τα τυπικά σφάλματα.

Αντίθετα, τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης δέκα οπτικών πεδίων (*Εικόνα 38*) από κύτταρα που είχαν προεπωασθεί σε υποξία για 24 ώρες έδειξαν σημαντικές διαφορές από τα προηγούμενα (4 ώρες υποξίας). Συγκεκριμένα, ο μέσος αριθμός των κοκκιδίων του στρες ανά κύτταρο αντί αύξησης παρουσίασε μείωση από 61 στη νορμοξία σε 29 κατά την υποξία και, αντίθετα, η μέση επιφάνεια των κοκκιδίων του στρες αντί να μειωθεί, αυξήθηκε από περίπου 0,4 μm^2 στη νορμοξία σε 0,7 μm^2 στην υποξία. Τέλος, παρόμοια με την τετράωρη προεπάση στην υποξία, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στο μέσο κλάσμα της συνολικής κυτταρικής επιφάνειας που καταλαμβάνουν όλα τα κοκκίδια του στρες σε ένα κύτταρο προς την επιφάνεια του ίδιου κυττάρου όταν είχε προηγηθεί 24ώρη υποξία (*Εικόνα 39*).

4.2.2 Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α

Για να μελετηθεί η επίδραση του οξειδωτικού στρες και του συνεπακόλουθου σχηματισμού κοκκιδίων τους στρες στην επαγωγή του HIF-1α από την υποξία, κύτταρα Huh7 και MCF7 που καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες, προεπώσθηκαν για 4 ή 24 ώρες σε υποξία και υπέστησαν επεξεργασία NaAsO₂ όπως προηγουμένως, υποβλήθηκαν σε κατεργασία για την απομόνωση του διαλυτού πρωτεϊνικού τους κλάσματος και ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του HIF-1α.



Εικόνα 40: Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα Huh7 και MCF7 που προεπώσθηκαν για 4 (A, B/δύο ξεχωριστά πειράματα) ή 24 ώρες υποξίας (Γ) πριν την κατεργασία με ή χωρίς 0,5 mM NaAsO₂ για 30 λεπτά. Η ανοσοανίχνευση έγινε με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του HIF-1α, και με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της τουμπουλίνης ή πολυκλωνικού έναντι της ακτίνης.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 40, σε κύτταρα Huh7, που είχαν προεπωασθεί για 4 ώρες σε υποξία, η προσθήκη NaAsO₂ προκάλεσε μία μικρή αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α σε σχέση με τα κύτταρα που δεν είχαν υποστεί επεξεργασία με NaAsO₂. Σε αντίθεση, στα κύτταρα MCF7, που είχαν προεπωασθεί για 4 ώρες σε υποξία ή στα κύτταρα Huh7 που είχαν προεπωασθεί για 24 ώρες σε υποξία, η προσθήκη NaAsO₂ προκάλεσε σημαντική ελάττωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α σε σχέση τα κύτταρα που είχαν παραμείνει σε υποξία χωρίς επίδραση με NaAsO₂.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΚΑΡΒΟΞΥΤΕΛΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗ ΤΟΥ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Η απόκριση των κυττάρων στην υποξία ρυθμίζεται κατά κύριο λόγο από τους επαγόμενους από την υποξία μεταγραφικούς παράγοντες (HIF). Ο HIF-1, έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει περιγραφεί η σημασία του σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η ερυθροποίηση, η εμβρυική ανάπτυξη και η αγγειογένεση, ενώ ταυτόχρονα έχει επισημανθεί ο κρίσιμος ρόλος του σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως οι ισχαιμίες και ο καρκίνος. Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο ο HIF-1 επηρεάζει τις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, προϋποθέτει την αποσαφήνιση των μηχανισμών που τον ρυθμίζουν. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί αρκετοί μηχανισμοί ρύθμισης του HIF-1 μέσω της HIF-1α υπομονάδας του, που φανερώνουν ένα μέρος της επίδρασης του πολυποίκιλου και μεταβαλλόμενου υποκυτταρικού περιβάλλοντος πάνω στη λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα.

Ο HIF-1α εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου σταθεροποιείται και είναι μεταγραφικά ενεργός. Ωστόσο σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου οι πρόλυλο-υδροξυλάσες ενεργοποιούνται και υδροξυλιώνουν τον HIF-1α, γεγονός που σηματοδοτεί την αποικοδόμησή του μέσω του πρωτεασώματος. Ανεξάρτητα από τις συνθήκες οξυγόνωσης ο HIF-1α ρυθμίζεται επίσης σε επίπεδο μεταγραφής, πρωτεϊνοσύνθεσης, μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ή και μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (12). Σημαντική θέση στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κατέχει η φωσφορυλίωση.

Σε προηγούμενης μελέτες του εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αναδείχθηκε ο μηχανισμός ρύθμισης του HIF-1α από τις ERK1/2. Οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α στις Ser⁶⁴¹ και Ser⁶⁴³, επάγοντας τη πυρηνική του συσσώρευση και την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας (57). Η περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 616-658 στον HIF-1α που περιέχει τόσο τις θέσεις φωσφορυλίωσης στις προαναφερθείσες σερίνες, όσο και ένα άτυπο υδρόφοβο σήμα πυρηνικής εξαγωγής (NES) έχει ονομαστεί ETD (ERK Targeted Domain). Η φωσφορυλίωση στις θέσεις αυτές αποκρύπτει το NES, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η σύνδεση της εξορτίνης CRM1 στον HIF-1α και η εξαγωγή του από τον πυρήνα. Έτσι, ο φωσφορυλιωμένος HIF-1α συσσωρεύεται στον πυρήνα όπου διμερίζεται με τον ARNT και επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων του (58).

Σε επόμενη μελέτη του εργαστηρίου Βιοχημείας αποδείχθηκε μία μη συμβατική και μηγενωμική δράση του HIF-1α που έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης μέσω

αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Σε συνθήκες υποξίας και αναστολής των κινασών ERK1/2, συντελείται η μετατόπιση του HIF-1α από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου η αλληλεπίδραση του HIF-1α μέσω της ETD περιοχής του με τη μορταλίνη τον οδηγεί στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Εκεί, ο HIF-1α αλληλεπιδρά με δύο επιπρόσθετες πρωτεΐνες, την εξοκινάση 2 και τον διάυλο ανιόντων VDAC σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που αναστέλει την απόπτωση. Ακόμη και σε νορμοξικές συνθήκες, η υπερέκφραση μεταγραφικά ανενεργών μορφών του μη τροποποιήσιμου από τις ERK HIF-1α, όπως πλήρους μήκους HIF-1α SA, HIF-1α (348-826) SA ή HIF-1α (575-826) SA, διεγείρει το σχηματισμό του πρωτεϊνικού συμπλόκου στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και οδηγεί σε αυξημένη ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων στην επαγόμενη από ετοποσίδιο ή δοξορουβικίνη απόπτωση. Ωστόσο, η υπερέκφραση μόνο της περιοχής ETD-SA του HIF-1α που συνδέεται στα μιτοχόνδρια δεν μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της απόπτωσης (60). Άρα, οι περιοχές εκατέρωθεν της ETD είναι υπεύθυνες για την αναστολή της απόπτωσης και ίσως να αποτελούν δυνητικές θέσεις για αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες που συνεισφέρουν θετικά στον αντι-αποπτωτικό ρόλο του HIF-1α στα μιτοχόνδρια. Επίσης από την παραπάνω μελέτη διαπιστώθηκε πως η μη φωσφορυλιωμένη ETD επαρκεί για την αλληλεπίδραση με τη μορταλίνη, αλλά παραμένει άγνωστο εάν η μορταλίνη αλληλεπιδρά και με περιοχές του HIF-1α εκτός της ETD. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας που σχετίζονται με τα παραπάνω συνοψίζονται ως εξής: πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του cDNA που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία 348-616 του HIF-1α σε πλασμιδιακό φορέα pGEX-4T1. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BL-21RIL με την εν λόγω πλασμιδιακή κατασκευή, καθώς και με άλλες δύο κατασκευές, τις pGEX-4T1HIF-1α 530-826 και pGEX-4T1HIF-1α 652-826, με στόχο την υπερέκφραση και τον καθαρισμό των τμημάτων 348-616, 530-826 και 652-826 του HIF-1α σε σύντηξη με GST. Ακολούθως, τα τμήματα του HIF-1α σε σύντηξη με GST χρησιμοποιήθηκαν σαν δολώματα σε πειράματα *in vitro* συγκατακρήμνισης πρωτεϊνών από κύτταρα Huh7. Ύστερα από ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και χρώση με AgNO₃ παρατηρήθηκε η παρουσία πρωτεϊνών στα εκλούσματα μεταξύ των οποίων ίσως κάποιες να βοηθούν τον HIF-1α στην αναστολή της απόπτωσης. Παράλληλα, ανιχνεύθηκε μία ζώνη στα 75 kDa που αλληλεπιδρά με το τμήμα 530-826 του HIF-1α και αντιστοιχεί στη μορταλίνη. Η αλληλεπίδραση αυτή αποτέλεσε ένα δείγμα θετικού ελέγχου της επιτυχίας του πειράματος. Η έλλειψη αλληλεπίδρασης της μορταλίνης με τα τμήματα 348-616 και 652-826 του HIF-1α που δεν φέρουν την ETD περιοχή, οδηγεί στο συμπέρασμα πως η ETD εκτός από επαρκής για την πρόσδεση της μορταλίνης (60) είναι και αναγκαία.

5.2 Η ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΜΕ ΤΑ ΚΟΚΚΙΔΙΑ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ

Εκτός από τον αντι-αποπτωτικό ρόλο που διαδραματίζει ο HIF-1, τα κοκκίδια του στρες (stress granules) φαίνεται να επιτελούν επίσης σημαντική αντι-αποπτωτική λειτουργία και είναι πιθανό να επικοινωνούν με τα μονοπάτια απόκρισης στην υποξία. Τα κοκκίδια του στρες είναι μη μεμβρανικά κοκκίδια που αποτελούνται από ανεσταλμένα σύμπλοκα έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης και περιλαμβάνουν παράγοντες έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης, mRNA, πρωτεΐνες δέσμευσης στο RNA και ριβοσωμικές υπομονάδες 40S (67). Τα κοκκίδια του στρες έχουν τρεις βασικούς λειτουργικούς ρόλους. Πρώτον με τη συσσώρευση σε αυτά πρωτεϊνών και mRNA η μετάφραση αναστέλλεται και το κύτταρο εξοικονομεί πολύτιμη για αυτό ενέργεια ώστε να αποκριθεί στο στρες και να επιβιώσει. Δεύτερον, λειτουργούν ως αποθήκες mRNA τα οποία θα απελευθερωθούν και θα μεταφραστούν μετά την ανάκαμψη από το στρεσογόνο ερέθισμα. Τρίτον, αποτελούν σηματοδοτικούς κόμβους (signalling hubs) μέσω συσσώρευσης σε αυτά πρωτεϊνών με ρυθμιστικό ρόλο επεμβαίνοντας με αυτόν τον τρόπο σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια με σκοπό την αναστολή της απόπτωσης (71).

Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό πως έντονη υποξία (0,1% O₂) ή η ανοξία (<0,1% O₂) πυροδοτούν το σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες σε καλλιεργούμενα καρκινικά κύτταρα (80, 90). Ωστόσο, όσον αφορά την ήπια υποξία (0,5-2% O₂), τα αποτελέσματα, ως προς το αν επάγει το σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες, είναι διφορούμενα και ποικίλλουν μεταξύ διαφορετικών ειδών κυττάρων (77, 80, 81, 91). Οι μοριακοί μηχανισμοί επαγωγής των κοκκιδίων από την ήπια υποξία δεν έχουν διευκρινιστεί στις ελάχιστες περιπτώσεις που παρατηρήθηκε ο σχηματισμός τους. Επιπλέον, η συνεισφορά της υποξίας στο σχηματισμό και στη δυναμική συναρμολόγησης των κοκκιδίων του στρες κάτω από την επίδραση ενός εξωγενούς στρες όπως η προσθήκη NaAsO₂ ή το αντίστροφο, δηλαδή η επίδραση του NaAsO₂ στα μονοπάτια απόκρισης στην υποξία, δεν έχουν μελετηθεί και αποτέλεσαν ερωτήματα προς απάντηση στη παρούσα εργασία.

Με πειράματα ανοσοφθορισμού, δείχθηκε ότι η προσθήκη NaAsO₂ σε κυτταρικές σειρές Huh7 και MCF7 τόσο σε νορμοξία όσο και μετά από 4 ή 24 ώρες υποξίας (1% O₂) προκαλεί το σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες. Η παρατήρησή των κοκκιδίων του στρες πραγματοποιήθηκε με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης G3BP1 που αποτελεί πρωτεΐνη που συναθροίζεται σε αυτά. Επίσης, διαπιστώθηκε πως στις δύο αυτές κυτταρικές σειρές η ήπια υποξία δεν αρκεί από μόνη της για να επάγει το σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε κύτταρα Huh7 και MCF7 που προεπωάστηκαν 4 ώρες σε υποξία και ακολούθως επεξεργάστηκαν με NaAsO₂ έδειξαν ότι

αυξάνεται ο αριθμός των κοκκιδίων του στρες ανά κύτταρο και μειώνεται η επιφάνεια ανά κοκκίδιο του στρες σε σχέση με τη νορμοξία. Σε αντίθεση, τα αποτελέσματα σε κύτταρα Huh7 που υπεβλήθησαν σε προεπώαση 24 ωρών υποξίας και έπειτα επεξεργάστηκαν με NaAsO_2 έδειξαν ότι μειώνεται ο αριθμός των κοκκιδίων του στρες ανά κύτταρο και αυξάνεται η επιφάνεια ανά κοκκίδιο του στρες σε σχέση με τη νορμοξία. Αυτές οι αντίθετες μεταβολές μεταξύ 4 και 24 ωρών υποξίας μπορούν ίσως να εξηγηθούν με βάση την τρέχουσα βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί πώς τα κοκκίδια του στρες αρχικά σχηματίζονται ως μικρές κυτταροπλασματικές εστίες, οι οποίες σταδιακά συσσωματώνονται σε μεγαλύτερες σε μέγεθος και μικρότερες σε αριθμό δομές, γεγονός που σηματοδοτεί την ωρίμανση τους. Αυτή η διαδικασία αναστέλλεται όταν συγκεκριμένες πρωτεΐνες που συσσωρεύονται στα κοκκίδια του στρες εξαντληθούν (σε ποσότητα), ή μεταλλαχθούν ή όταν αποσταθεροποιηθούν οι μικροσωληνίσκοι (92). Με βάση τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, φαίνεται ότι η υποξία 4 ωρών αναστέλλει τη διαδικασία ωρίμανσης των κοκκιδίων του στρες, ενώ η υποξία 24 ωρών την προωθεί. Αυτή η διαφορά μεταξύ 4 και 24 ωρών υποξίας, ίσως να ερμηνεύεται από το γεγονός ότι οι 24 ώρες στην υποξία αποτελούν αρκετό χρόνο για την έκφραση των γονιδίων-στόχων του HIF-1α και ίσως κάποια από τα πρωτεϊνικά προϊόντα της μεταγραφικής του δραστηριότητας να αποτελούν παράγοντες που συναθροίζονται στα κοκκίδια του στρες, διευκολύνουν την ωρίμανσή τους και βοηθούν στην προσαρμογή και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Από την άλλη μεριά, η ωρίμανση των κοκκιδίων του στρες που επάγονται από το NaAsO_2 ίσως να αναστέλλεται στα πρώιμα στάδια της υποξίας (δημιουργώντας πολλά σε αριθμό και μικρά σε μέγεθος κοκκίδια) λόγω της αυξημένης παραγωγής ROS από τα μιτοχόνδρια. Η συγκεκριμένη υπόθεση συνάδει με δεδομένα από πρόσφατη εργασία η οποία έδειξε ότι το H_2O_2 , το οποίο επίσης προκαλεί την άμεση παραγωγή ROS, ανέστειλλε την ωρίμανση των κοκκιδίων του στρες που σχηματίστηκαν μετά από προσθήκη NaAsO_2 (93).

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε επίσης η επίδραση του NaAsO_2 στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα Huh7 και MCF7 που καλλιεργήθηκαν σε νορμοξία ή προεπώαστηκαν σε υποξία για 4 ή 24 ώρες. Σε κύτταρα MCF7 που είχαν προεπωασθεί σε σύντομη υποξία, διαπιστώθηκε δραματική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α μετά από προσθήκη NaAsO_2 . Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε κύτταρα Huh7 που είχαν προεπωασθεί σε 24ωρη υποξία, όχι όμως σε αυτά που είχαν προεπωασθεί για 4 ώρες. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με μελέτες που δείχνουν επαγωγή των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α από το NaAsO_2 σε ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα (94) και καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145 (95, 96). Τονίζεται ότι η συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου NaAsO_2 έχει κάθε φορά διαφορετικές επιδράσεις στις ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις και ειδικά στα επίπεδα

του HIF-1α. Επίσης, η διαφορά που παρατηρείται στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α μεταξύ κυττάρων Huh7 και MCF7 ίσως να σχετίζεται με το είδος του κυττάρου ή ειδικότερα την αντίσταση στην επίδραση του NaAsO₂. Δηλαδή, ίσως τα Huh7 να είναι είναι πιο ανθεκτικά στην επίδραση του NaAsO₂ από ότι τα MCF7 διότι διαθέτουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική προστασία και η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α μόνο μετά από υποξική έκθεση 24 ωρών να οφείλεται εκτός από το NaAsO₂ και στην ύπαρξη ενός βρόχου αρνητικής ανατροφοδότησης, όπου ο HIF-1α επάγει την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την PHD2 με αποτέλεσμα η αποικοδόμηση του να γίνεται πιο εύκολα (28).

Καθώς ο HIF-1 εμπλέκεται σε σοβαρές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, η ανακάλυψη νέων αλληλεπιδράσεων που ρυθμίζουν την δράση του μπορεί να ανοίξει τον δρόμο για νέες μεθόδους διάγνωσης ή θεραπείας. Η μελέτη της επίδρασης της υποξίας στο σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες που επάγεται από NaAsO₂ ή το αντίστροφο είναι σημαντική, καθώς σε έναν αναπτυσσόμενο όγκο ή σε όγκο που έχει υποβληθεί σε θεραπεία, τα καρκινικά κύτταρα πολύ συχνά συναντούν τόσο υποξικές όσο και οξειδωτικές ή αλλές συνθήκες που ευνοούν το σχηματισμό των κοκκιδίων του στρες. Η συνεισφορά των κοκκιδίων του στρες στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε τέτοιες συνθήκες δεν είναι γνωστή. Είναι πιθανόν ότι η ταυτόχρονη στόχευση τόσο της απόκρισης στην υποξία όσο και των μονοπατιών σχηματισμού των κοκκιδίων του στρες μπορεί να αποτελέσει ένα αποτελεσματικό τρόπο για τη καταστροφή των καρκινικών κυττάρων σε συμπαγείς όγκους χωρίς τη δημιουργία ανθεκτικότητας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. Annual review of pathology. 2014;9:47-71. Epub 2013/08/14.
2. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. Physiology (Bethesda). 2009;24:97-106. Epub 2009/04/15.
3. Dunwoodie SL. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. Dev Cell. 2009;17(6):755-73. Epub 2010/01/12.
4. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, et al. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell. 2010;7(3):391-402. Epub 2010/09/02.
5. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. J Clin Invest. 2007;117(6):1616-26. Epub 2007/06/06.
6. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(9):4273-8. Epub 1997/04/29.
7. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. Gene Expr. 1998;7(3):205-13. Epub 1998/12/05.
8. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(12):5510-4. Epub 1995/06/06.
9. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2014;49(1):1-15. Epub 2013/10/09.
10. Smirnova NA, Hushpulian DM, Speer RE, Gaisina IN, Ratan RR, Gazaryan IG. Catalytic mechanism and substrate specificity of HIF prolyl hydroxylases. Biochemistry (Mosc). 2012;77(10):1108-19. Epub 2012/11/20.
11. Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, Ohh M. Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. FASEB J. 2005;19(11):1396-406. Epub 2005/08/30.
12. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell. 2012;148(3):399-408. Epub 2012/02/07.
13. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Molecular and cellular biology. 1992;12(12):5447-54. Epub 1992/12/01.
14. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. Semin Cancer Biol. 2009;19(1):12-6. Epub 2008/12/31.
15. Kourtis M, Ikonomidou G, Giakoumakis NN, Rapsomaniki MA, Landegren U, Siniosoglou S, et al. CK1delta restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1alpha/ARNT complex formation. Cell Signal. 2015;27(6):1129-40. Epub 2015/03/07.
16. Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniosoglou S, Simos G. Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. Journal of cell science. 2012;125(Pt 14):3485-93. Epub 2012/04/03.
17. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. Molecular and cellular biology. 2003;23(24):9361-74. Epub 2003/12/04.
18. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. Genes Dev. 1997;11(1):72-82. Epub 1997/01/01.
19. Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. FASEB J. 2003;17(2):271-3. Epub 2002/12/20.

20. Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(4):285-96. Epub 2008/02/21.
21. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(2):281-90. Epub 2007/07/03.
22. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Hypoxia in cancer cell metabolism and pH regulation. *Essays Biochem*. 2007;43:165-78. Epub 2007/08/21.
23. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006;3(3):177-85. Epub 2006/03/07.
24. Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 2007;129(1):111-22. Epub 2007/04/10.
25. Schito L, Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer*. 2016;2(12):758-70. Epub 2017/07/26.
26. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):378-89. Epub 2015/11/19.
27. Chen W, Hill H, Christie A, Kim MS, Holloman E, Pavia-Jimenez A, et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature*. 2016;539(7627):112-7. Epub 2016/11/04.
28. Ratcliffe PJ. Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *J Physiol*. 2013;591(8):2027-42. Epub 2013/02/13.
29. Semenza GL. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*. 2001;107(1):1-3. Epub 2001/10/12.
30. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*. 2008;30(4):393-402. Epub 2008/05/24.
31. Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 2):301-11. Epub 2004/12/24.
32. Kenneth NS, Rocha S. Regulation of gene expression by hypoxia. *The Biochemical journal*. 2008;414(1):19-29. Epub 2008/07/25.
33. Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(11):9899-904. Epub 2004/01/01.
34. Gorlach A, Bonello S. The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *The Biochemical journal*. 2008;412(3):e17-9. Epub 2008/05/24.
35. Niu G, Briggs J, Deng J, Ma Y, Lee H, Kortylewski M, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1 α RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells. *Mol Cancer Res*. 2008;6(7):1099-105. Epub 2008/07/23.
36. Papadakis AI, Paraskeva E, Peidis P, Muaddi H, Li S, Raptis L, et al. eIF2 $\{\alpha\}$ Kinase PKR modulates the hypoxic response by Stat3-dependent transcriptional suppression of HIF-1 $\{\alpha\}$. *Cancer Res*. 2010;70(20):7820-9. Epub 2010/10/07.
37. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):721-32. Epub 2003/09/18.
38. Semenza GL. A compendium of proteins that interact with HIF-1 α . *Exp Cell Res*. 2017;356(2):128-35. Epub 2017/03/25.
39. Liu YV, Semenza GL. RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 α degradation vs. stabilization. *Cell Cycle*. 2007;6(6):656-9. Epub 2007/03/16.
40. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011;12(1):9-22. Epub 2011/12/16.
41. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Molecular cell*. 2010;38(6):864-78. Epub 2010/07/14.
42. Geng H, Liu Q, Xue C, David LL, Beer TM, Thomas GV, et al. HIF1 α protein stability is increased by acetylation at lysine 709. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(42):35496-505. Epub 2012/08/22.

43. Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(29):21513-8. Epub 1993/10/15.
44. Mottet D, Ruys SP, Demazy C, Raes M, Michiels C. Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int J Cancer*. 2005;117(5):764-74. Epub 2005/06/16.
45. Lancaster DE, McNeill LA, McDonough MA, Aplin RT, Hewitson KS, Pugh CW, et al. Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *The Biochemical journal*. 2004;383(Pt. 3):429-37. Epub 2004/07/09.
46. Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1alpha. *Molecular cell*. 2010;40(4):509-20. Epub 2010/11/26.
47. Flugel D, Gorchach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(9):3253-65. Epub 2007/02/28.
48. Xu D, Yao Y, Lu L, Costa M, Dai W. Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1alpha. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(50):38944-50. Epub 2010/10/05.
49. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 17):2976-86. Epub 2010/08/12.
50. Warfel NA, Dolloff NG, Dicker DT, Malysz J, El-Deiry WS. CDK1 stabilizes HIF-1alpha via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth. *Cell Cycle*. 2013;12(23):3689-701. Epub 2013/11/06.
51. Hubbi ME, Gilkes DM, Hu H, Kshitiz, Ahmed I, Semenza GL. Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha to promote cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(32):E3325-34. Epub 2014/07/30.
52. Bullen JW, Tchernyshyov I, Holewinski RJ, DeVine L, Wu F, Venkatraman V, et al. Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. *Sci Signal*. 2016;9(430):ra56. Epub 2016/06/02.
53. Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, et al. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1783(3):394-404. Epub 2008/01/12.
54. Chachami G, Paraskeva E, Mingot JM, Braliou GG, Gorchach D, Simos G. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(2):235-40. Epub 2009/10/01.
55. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 2003;15(5):463-9. Epub 2003/03/18.
56. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(46):32631-7. Epub 1999/11/07.
57. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(44):33095-106. Epub 2006/09/07.
58. Mylonis I, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(41):27620-7. Epub 2008/08/09.
59. Simos IMAg. The Involvement of the ERK-Hypoxia-Angiogenesis Signaling Axis and HIF-1 in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatocellular Carcinoma-Basic Research*. 2012:253-74.
60. Mylonis I, Kourti M, Samiotaki M, Panayotou G, Simos G. Mortalin-mediated and ERK-controlled targeting of HIF-1alpha to mitochondria confers resistance to apoptosis under hypoxia. *Journal of cell science*. 2017;130(2):466-79. Epub 2016/12/03.
61. Sandoel A, Hengartner MO. Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology (Bethesda)*. 2014;29(3):168-76. Epub 2014/05/03.

62. Ney PA. Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1853(10 Pt B):2775-83. Epub 2015/03/11.
63. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljubic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. *EMBO reports*. 2016;17(10):1374-95. Epub 2016/09/16.
64. Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A. The eIF2alpha kinases: their structures and functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013;70(19):3493-511. Epub 2013/01/29.
65. McEwen E, Kedersha N, Song B, Scheuner D, Gilks N, Han A, et al. Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(17):16925-33. Epub 2005/02/03.
66. Baird TD, Wek RC. Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism. *Adv Nutr*. 2012;3(3):307-21. Epub 2012/05/16.
67. Anderson P, Kedersha N. Stress granules. *Current biology : CB*. 2009;19(10):R397-8. Epub 2009/05/27.
68. Anderson P, Kedersha N. Stressful initiations. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 16):3227-34. Epub 2002/07/26.
69. Kedersha N, Panas MD, Achorn CA, Lyons S, Tisdale S, Hickman T, et al. G3BP-Caprin1-USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. *The Journal of cell biology*. 2016;212(7):845-60. Epub 2016/03/30.
70. Anderson P, Kedersha N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(6):430-6. Epub 2009/05/23.
71. Kedersha N, Ivanov P, Anderson P. Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends in biochemical sciences*. 2013;38(10):494-506. Epub 2013/09/14.
72. Panas MD, Ivanov P, Anderson P. Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics. *The Journal of cell biology*. 2016;215(3):313-23. Epub 2016/11/09.
73. Protter DS, Parker R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends in cell biology*. 2016;26(9):668-79. Epub 2016/06/13.
74. Buchan JR. mRNP granules. Assembly, function, and connections with disease. *RNA biology*. 2014;11(8):1019-30. Epub 2014/12/23.
75. Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular cell*. 2009;36(6):932-41. Epub 2010/01/13.
76. Takahara T, Maeda T. Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress. *Molecular cell*. 2012;47(2):242-52. Epub 2012/06/26.
77. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nature cell biology*. 2008;10(11):1324-32. Epub 2008/10/07.
78. Anderson P, Kedersha N, Ivanov P. Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1849(7):861-70. Epub 2014/12/09.
79. Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, et al. Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production. *Molecular and cellular biology*. 2013;33(4):815-29. Epub 2012/12/12.
80. Gottschald OR, Malec V, Krasteva G, Hasan D, Kamlah F, Herold S, et al. TIAR and TIA-1 mRNA-binding proteins co-aggregate under conditions of rapid oxygen decline and extreme hypoxia and suppress the HIF-1alpha pathway. *Journal of molecular cell biology*. 2010;2(6):345-56. Epub 2010/10/29.
81. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer cell*. 2004;5(5):429-41. Epub 2004/05/18.
82. Lyons SM, Fay MM, Akiyama Y, Anderson PJ, Ivanov P. RNA biology of angiogenin: Current state and perspectives. *RNA biology*. 2017;14(2):171-8. Epub 2016/12/25.
83. Sebastia J, Kieran D, Breen B, King MA, Nettelband DF, Joyce D, et al. Angiogenin protects motoneurons against hypoxic injury. *Cell death and differentiation*. 2009;16(9):1238-47. Epub 2009/05/16.

84. Lasham A, Print CG, Woolley AG, Dunn SE, Braithwaite AW. YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target? *The Biochemical journal*. 2013;449(1):11-23. Epub 2012/12/12.
85. Ivanov P, Emara MM, Villen J, Gygi SP, Anderson P. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Molecular cell*. 2011;43(4):613-23. Epub 2011/08/23.
86. Lyons SM, Achorn C, Kedersha NL, Anderson PJ, Ivanov P. YB-1 regulates tRNA-induced Stress Granule formation but not translational repression. *Nucleic acids research*. 2016;44(14):6949-60. Epub 2016/05/14.
87. Somasekharan SP, El-Naggar A, Leprivier G, Cheng H, Hajee S, Grunewald TG, et al. YB-1 regulates stress granule formation and tumor progression by translationally activating G3BP1. *The Journal of cell biology*. 2015;208(7):913-29. Epub 2015/03/25.
88. El-Naggar AM, Veinotte CJ, Cheng H, Grunewald TG, Negri GL, Somasekharan SP, et al. Translational Activation of HIF1alpha by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis. *Cancer cell*. 2015;27(5):682-97. Epub 2015/05/13.
89. Lyberopoulou A, Venieris E, Mylonis I, Chachami G, Pappas I, Simos G, et al. MgcRacGAP interacts with HIF-1alpha and regulates its transcriptional activity. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2007;20(6):995-1006. Epub 2007/11/06.
90. Gardner LB. Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(11):3729-41. Epub 2008/03/26.
91. Lane DJ, Saletta F, Suryo Rahmanto Y, Kovacevic Z, Richardson DR. N-myc downstream regulated 1 (NDRG1) is regulated by eukaryotic initiation factor 3a (eIF3a) during cellular stress caused by iron depletion. *PloS one*. 2013;8(2):e57273. Epub 2013/02/26.
92. Aulas A, Vande Velde C. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:423. Epub 2015/11/12.
93. Arimoto-Matsuzaki K, Saito H, Takekawa M. TIA1 oxidation inhibits stress granule assembly and sensitizes cells to stress-induced apoptosis. *Nature communications*. 2016;7:10252. Epub 2016/01/08.
94. Xu Y, Li Y, Li H, Pang Y, Zhao Y, Jiang R, et al. The accumulations of HIF-1alpha and HIF-2alpha by JNK and ERK are involved in biphasic effects induced by different levels of arsenite in human bronchial epithelial cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 2013;266(2):187-97. Epub 2012/12/01.
95. Gao N, Shen L, Zhang Z, Leonard SS, He H, Zhang XG, et al. Arsenite induces HIF-1alpha and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2004;255(1-2):33-45. Epub 2004/02/20.
96. Skinner HD, Zhong XS, Gao N, Shi X, Jiang BH. Arsenite induces p70S6K1 activation and HIF-1alpha expression in prostate cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2004;255(1-2):19-23. Epub 2004/02/20.